

3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide als antiplasmodiale Wirkstoffe

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

Von Sandra Isabel Schweda

Aus Seesen

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick

2. Referent: Professor Dr. Ingo Ott

Eingereicht am: 11.01.2021

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.04.2021

Druckjahr 2021

*Für meine Eltern,
die ihren Kindern ihr Leben lang unermüdliche Unterstützung entgegenbringen.*

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Schweda, S. I., Alder, A., Gilberger, T., Kunick, C.: 4-Arylthieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxamides are a new class of antiplasmodial agents. *Molecules*, 2020, 3187.

Masch, A., Nasereddin, A., Alder, A., Bird, M. J., Schweda, S. I., Preu, L., Doerig, C., Dzikowski, R., Gilberger, T. W., Kunick, C.: Structure-activity relationships in a series of antiplasmodial thieno[2,3-*b*]pyridines. *Malar. J.* 2019, 18, 89.

Tagungsbeiträge:

Schweda, S. I., Alder, A., Gilberger, T., Kunick, C.: 2-Carbamoylthieno[2,3-*b*]pyridines constitute a new class of antiplasmodial agents (Poster). 8. EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry. Athen, Griechenland, 01.09. - 05.09.2020.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2018 bis Dezember 2020 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich für die Überlassung des spannenden Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die großartige Zeit in seinem Arbeitskreis von Herzen danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Korreferats.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.2 Die Erreger der Malaria	2
1.3 Vektoren	3
1.4 Lebenszyklus der Parasiten	3
1.5 Abwehr- und Therapieoptionen	5
1.5.1 Abwehr der Insekten	6
1.5.2 Immunisierung.....	7
1.5.3 Antimalaria-Therapeutika	7
1.5.3.1 Arylaminoalkohole.....	7
1.5.3.2 4-Aminochinoline	8
1.5.3.3 Antifolate.....	9
1.5.3.4 Naphthochinone.....	11
1.5.3.5 8-Aminochinoline	12
1.5.3.6 Antibiotika	13
1.5.3.7 Artemisinine	14
1.6 Ausblick auf neue Wirkstoffe	16
1.7 Proteinkinasen als neue potenzielle Targets.....	20
1.7.1 Plasmodiales Kinom.....	24
1.7.1.1 Die PfGSK-3.....	27
1.7.1.1.1 Forschung an PfGSK-3-Inhibitoren	28
1.8 Bedeutung physikochemischer Eigenschaften in der Wirkstoffentwicklung.....	32
1.8.1 Löslichkeit.....	34
1.8.2 <i>Ligand efficiency</i> und <i>lipophilic ligand efficiency</i>	38
2 Zielsetzung.....	40
3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	42

3.1	Homologiemodelle der <i>Pf</i> GSK-3	43
3.2	Bindemodus der Kokristallstruktur in der <i>Hs</i> GSK-3.....	45
3.3	<i>docking</i> -Experimente mit 39b	46
3.4	Bindemodus von 42	47
3.5	Bindemodus von 46f	49
3.6	Bindemodus von 47k	50
4	Synthesen	53
4.1	Synthese 4-substituierter Benzaldehyd-Derivate.....	53
4.2	Synthese von <i>N</i> -substituierten 2-Chloracetamiden	56
4.3	4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione	57
4.3.1	Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione	57
4.3.2	Synthese neuer 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione	65
4.3.3	Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thionen.....	68
4.3.3.1	Röntgenkristallstrukturanalyse des Thiopyran-Nebenprodukts	68
4.3.3.2	Verwendung <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> -Trimethylethan-1,2-diamin-substituierter Benzaldehyde in der Eintopf-Synthese	69
4.4	Synthese von Pyridinthion-Derivaten ausgehend von 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamiden. 70	
4.4.1	Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide	70
4.4.2	Synthese neuer 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide.....	71
4.4.3	Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamiden.....	72
4.4.4	Synthese neuer Pyridinthion-Derivate ausgehend von 61	73
4.4.5	Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten sowie analytische Besonderheiten bei der Synthese von Pyridinthion-Derivaten ausgehend von 61	74
4.4.5.1	Isolierung des reduzierten Knoevenagel-Intermediats	74
4.4.5.2	Massenspektrometrische Detektion des Dimers	76
4.4.5.3	Bestätigung der Struktur des Pyridinthions mittels ¹³ C-NMR-Analyse.....	77

4.5	3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide	78
4.5.1	Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridine durch Thorpe-Ziegler-Zyklisierung	78
4.5.2	Synthese neuer 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide	80
4.5.3	Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamiden	84
4.5.3.1	Isolierung des unzyklisierten Derivats 89	84
4.5.3.2	Röntgenkristallstrukturanalyse von 46d	85
4.5.3.3	Isolierung des Nebenprodukts bei der Aufreinigung von 93	85
4.5.3.4	Modifizierung der Reaktionsbedingungen bei der Synthese von 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamiden.....	87
4.5.4	Synthese des 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamids aus einem Thiopyran.....	88
4.6	Analytische Besonderheiten.....	88
4.6.1	NMR-Analyse von 46l	88
4.6.2	Unbekanntes Signal im IR-Spektrum von 46j	89
4.6.3	Fehlendes Kohlenstoffsignal bei den Boc-geschützten Piperazinderivaten.....	90
4.6.4	Dynamische Differenzkalometrie	91
4.6.5	HPLC-Messungen.....	92
5	Stabilitätsuntersuchungen von 46f	98
6	Biologische Aktivität	101
6.1	Modifikation der Strukturelemente A und C	101
6.2	Modifikation an 4-Position des Rings A und durch Halogensubstituenten an Ring C	104
6.3	Modifikation der Region C	107
6.4	Variation in Region B	110
7	Physikochemische Eigenschaften	116
7.1	Löslichkeitsuntersuchungen	123
7.1.1	Kinetische Löslichkeit	123
7.1.2	Thermodynamische Löslichkeit	127

8	Zusammenfassung.....	132
9	Summary.....	134
10	Experimenteller Teil	136
10.1	Molekulares <i>docking</i>	136
10.2	Geräte und Methoden.....	136
10.3	Synthesen und analytische Daten	142
10.4	Biologische Assays	230
10.5	Vorhersage der physikochemischen Eigenschaften	236
10.6	Löslichkeitsuntersuchungen	236
10.6.1	Thermodynamische Löslichkeit	236
10.6.2	Kinetische Löslichkeit	237
10.7	Stabilitätsuntersuchungen	237
10.7.1	Probenpräparation unter Lichtausschluss.....	237
10.7.2	Probenpräparation unter Lichteinfluss	238
11	Verzeichnisse	239
11.1	Abbildungsverzeichnis	239
11.2	Formelverzeichnis.....	241
11.3	Schemataverzeichnis	242
11.4	Tabellenverzeichnis	243
12	Literaturverzeichnis.....	246

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	CSA	Chondroitinsulfat A
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	cS _{Ali}	Vorhergesagte Löslichkeit nach Ali
ACN	Acetonitril	cS _{ESOL}	Vorhergesagte Löslichkeit mit Hilfe der ESOL-Gleichung
ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>	CSP	Circumsporozoiten Protein
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Eliminierung	cS _{Yalkowsky}	Vorhergesagte Löslichkeit nach Yalkowsky
AMA	<i>Apical membrane antigene</i>	CYP2C19	Cytochrom P450 2C19
AMBER 10:	<i>Assisted model building and energy refinement: Extended Hueckel theory</i>	CYP450	Cytochrom P450
EHT			
Anhyd.	<i>Anhydrous</i>	δ	Chemische Verschiebung
AP	<i>Aromatic proportion</i>	ΔG	Freie Bindungsenergie nach Gibbs
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	d	Dublett
APCI-DI pos.	<i>Atmospheric pressure chemical ionization-Direktinjektion positiv</i>	DAD	Diodenarray-Detektor
Modus			
APCI-DI neg.	<i>Atmospheric pressure chemical ionization-Direktinjektion negativ</i>	DC	Dünnschichtchromatographie
Modus			
äq.	Äquivalent	DCM	Dichlormethan
Ar	Anzahl an Aromaten	dd	Dublett von Dublett
ArH	Aromatisches Proton	ddd	Dublett von Dublett von Dublett
Asp	Asparaginsäure	DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
ATP	Adenosintriphosphat	DEPT	<i>Distorsionsless enhancement by Optimization transfer</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>	Dest.	Destilliert
BCS	<i>Biopharmaceutics classification system</i>	DFG	Aspartat (D), Phenylalanin (F), Glycin (G)
ber.	Berechnet	DHA	Dihydroartemisinin
bidest.	Bidestilliert	DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
Boc	<i>tert-Butyloxycarbonyl-</i>	DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
br	Breites Signal	DHPS	Dihydropteroat-Synthase
BSA	Bovines Serumalbumin	DMF	<i>N,N</i> -Dimethylsulfoxid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>	DMSO- <i>d</i> ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
CDCl ₃	Deuteriochloroform	DNA	Desoxyribonukleinsäure
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
CDPK	<i>Calcium dependent protein kinase</i>	dt	Dublett von Triplett
CHN	Elementaranalyse	EA	Ethylacetat
CLK	<i>CDC2-like kinase</i>	EI	Elektronenstoß-Ionisation
clogD _{pH7.4}	<i>Calculated (berechneter) logD-Wert bei pH7.4</i>	EPCR	<i>Endothelial protein C receptor</i>
clogP	<i>Calculated (berechneter) logP-Wert</i>		
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
CRISP/R-Cas	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated Protein</i>	ESI	Elektrospray-Ionisation
		<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>

EtOH	Ethanol	K _D	Dissoziationskonstante
FaSSiF	<i>Fasted state simulated fluid</i>	KOH	Kaliumhydroxid
FDA	<i>Food and drug Administration</i>	konz.	Konzentriert
FeSSiF	<i>Fed state simulated fluid</i>	λ_{\max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
Fsp ³	Fraktion sp ³ -hybridisierter Kohlenstoffatome	LE	<i>Ligand efficiency</i>
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>	LLE	<i>Lipophilic ligand efficiency</i>
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	Lit.	Literatur
gef.	Gefunden	LLINs	<i>Long-lasting insecticidal nets</i>
gk	<i>Gatekeeper</i>	logP	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Koeffizienten
Gln	Glutamin	logS ₀	Dekadischer Logarithmus der molaren Löslichkeit
Glu	Glutaminsäure	LtQ	<i>Linear trap quadrupol</i>
GOLD	<i>Genetic Optimization for ligand docking</i>	Lys	Lysin
Gra.	Gradient	m	Multipllett
GSE	<i>General Solubility Equation</i>	mAU	<i>Milli absorbance units</i>
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
GTP	Guanosintriphosphat	MDA	<i>Mass drug administration</i>
h	<i>Hours</i> (Stunden)	MDGs	<i>Millenium Development Goals</i>
HA	<i>Heavy atoms</i>	Me	Methyl
Hal	Halogen	Met	Methionin
HBA	Wasserstoffbrückenakzeptoren	MHz	Megahertz
HBD	Wasserstoffbrückendonatoren	[M] ⁺	Molekülradikalkation
HEK293T	<i>Human embryonic kidney</i> 29-Zellen	μM	Mikromolar
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>	MOE	<i>Molecular operating environment</i>
HsCDK2	<i>Homo sapiens cyclin dependent kinase 2</i>	MP	<i>Melting point</i> (Schmelzpunkt)
HsGSK-3	<i>Homo sapiens</i> Glycogen-Synthase-Kinase-3	M _r	Relative Molmasse
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
HTS	<i>High throughput screening</i>	MS	Massenspektrometrie
Hz	Hertz	MW	Mikrowelle
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration</i> 50%	m/z	Masse pro Ladungseinheit
Ile	Isoleucin	n. b.	Nicht bestimmt
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	n. d.	Nicht detektiert
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	NimA	<i>Never-in-mitosis, gene A</i>
IPTi	<i>intermittent preventive treatment for children</i>	nM	Nanomolar
IPTp	<i>Intermittent preventive treatment in pregnancy</i>	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
Isokr.	Isokratisch	NTU	<i>Nephelometric turbidity units</i>
ITN	<i>Insecticide-treated net</i>	o. g.	Oben genannt
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Ox.	Oxidation
J	Kopplungskonstante	p	Pentett

<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Pf</i> UBC13	<i>P. falciparum</i> ubiquitin-conjugating enzyme 13
PBO	Piperonylbutoxid	<i>Pf</i> UGT	<i>P. falciparum</i> UDP-Galaktose-Transporter
PDB	<i>Protein data bank</i>	PGH1	<i>P. glycoprotein</i> homologue 1
PE	Petrolether	Ph	Phenyl
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>	pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	pIC ₅₀	Negativ dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Werts
<i>Pf</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> des Stamms 3D7	PK	Proteinkinase
<i>Pf</i> ACT	<i>P. falciparum</i> Acetyl-CoA-Transporter	pK _A	Säurekonstante
<i>Pf</i> Ark	<i>P. falciparum</i> Aurora-verwandte Kinase	PKC	Proteinkinase C
<i>Pf</i> ATP6	Plasmodialer Natrium-ATPase-6-Ionenkanal	ppm	<i>Parts per million</i>
<i>Pf</i> CARL	<i>P. falciparum</i> cyclic amine resistance locus	PSA	<i>Polar surface area</i>
<i>Pf</i> CK1	Plasmodiale Casein Kinase 1	RB	Rotierbare Bindungen
<i>Pf</i> CRK3	<i>P. falciparum</i> cdk-related kinase 3	RIFIN	<i>Repetitive interspersed family</i>
<i>Pf</i> CRT	<i>P. falciparum</i> chloroquine resistance transporter	RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
<i>Pf</i> DHODH	<i>P. falciparum</i> Dihydroorotat-Dehydrogenase	RNA	Ribonukleinsäure
<i>Pf</i> EMP1	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1	Ro5	<i>Rule of five</i>
<i>Pf</i> MAP	Plasmodiale MAPK	RP	<i>Reversed phase</i>
<i>Pf</i> MDR1	<i>P. falciparum</i> multidrug resistance 1	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
<i>Pf</i> MRK	<i>P. falciparum</i> MO-15 related kinase	RT	Raumtemperatur
<i>Pf</i> NEK1-4	<i>P. falciparum</i> NimA related kinase 1-4	s	Singulett
<i>Pf</i> NF54-Luc	Lumineszenz-basierter Luciferase-Assay an mit <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten des Stamms NF54	S ₀	Intrinsische Löslichkeit
<i>Pf</i> NHE1	<i>P. falciparum</i> sodium/hydrogen exchanger 1	Schmp.	Schmelzpunkt
<i>Pf</i> PI3K	<i>P. falciparum</i> Phosphatidylinositol-3-Kinase	SERCA	Sarkoplasmatisch/endoplasmatisch retikuläre Calcium-Adenosin-Triphosphatase
<i>Pf</i> PI4K	<i>P. falciparum</i> Phosphatidylinositol-4-Kinase	SFI	<i>Solubility Forecast Index</i>
<i>Pf</i> PK5	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase 5	SGF	<i>Simulated gastric fluid</i>
<i>Pf</i> PK7	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase 7	SIF	<i>Simulated intestinal fluid</i>
<i>Pf</i> PK9	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase 9	S _{kin}	Kinetische Löslichkeit
<i>Pf</i> PKA	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase A	SMC	<i>Seasonal Malaria chemoprevention</i>
<i>Pf</i> PKB	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase B	Sog.	Sogenannt
<i>Pf</i> PKG	<i>P. falciparum</i> Proteinkinase G	SsGSK-3	<i>Sus scrofa</i> GSK-3
<i>Pf</i> SUB1	<i>P. falciparum</i> subtilisin-like serin protease	STEVOR	<i>Subtelomeric variable open reading frame</i>

S _{therm}	Thermodynamische Löslichkeit
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TK	Tyrosin-Kinase
TKL	<i>Tyrosin-kinase-like</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
t _m	Totzeit
t _{ms}	Gesamtretentionszeit
TMS	Tetramethylsilan
TPSA	<i>Topological polar surface area</i>
TSP	Thrombospondin
Tyr	Tyrosin
TyrK	Tyrosin-Kinasen
UN	<i>United Nations</i>
UV	Ultraviolett
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSA	<i>Variant surface antigene</i>
W	Watt
WDI	<i>World Drug Index</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zers.	Zersetzung

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die seit unzähligen Jahren Millionen Menschenleben fordert. Insgesamt übersteigt die Zahl der durch Infektionskrankheiten wie Malaria und Tuberkulose bedingten Toten sämtliche durch Kriege bedingte Todesfälle.¹ Im Jahr 1955 leitete die *World Health Organization* (WHO) erstmals flächendeckend das *Global Malaria Eradication Program* zur Bekämpfung der Malaria ein. Durch den Einsatz von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) sowie konsequenter Chloroquin-Therapien sollten die Malariaerreger ausgerottet werden. Nach ersten großen Erfolgen ließen insektizidresistente Moskitos und arzneimittelresistente Parasiten die Anzahl an Malariafällen jedoch erneut stark ansteigen.^{2,3} In Folge fehlender Investitionen und wenig ambitionierter Bemühungen wurde 2004 ein neuer Höchststand von über 1.8 Millionen Todesfällen durch Malaria verzeichnet.⁴ Tropische und subtropische Länder sind überwiegend betroffen⁵, sodass die Malaria vor allem eine Krankheit der armen Bevölkerung⁶ und somit aufgrund der geringen Profiterwartung unattraktiv für forschende Pharmafirmen ist. Seit der Aufnahme der Malaria-Bekämpfung in die *Millenium Declaration* und in die *Millenium Development Goals* (MDGs) durch die UN-Generalversammlung im Jahr 2000 wurden Fortschritte in der Prävention und der Therapie der Malaria verzeichnet.⁷ Nachfolgend hat die WHO seit 2015 mit Hilfe der *Global Technical Strategy for Malaria 2016 - 2030* vier große Ziele definiert:

1. Die Mortalität weltweit um 90% zu senken.
2. Die Inzidenz weltweit um 90% zu senken.
3. Die Eliminierung der Malaria in wenigstens 35 Ländern.
4. Das Wiederaufkommen der Malaria in derzeitigen malariafreien Gebieten verhindern.

Die Vision der WHO ist eine Welt frei von Malaria.⁸ Trotz all dieser Bemühungen wurde im Jahr 2018 die durch Malaria bedingte Anzahl an Infektionen auf 228 Millionen geschätzt. Hiervon starben etwa 405 000 Menschen. Aufgrund des noch nicht entwickelten Immunsystems sind Kinder unter fünf Jahren mit 67% aller weltweiten Todesfälle durch Malaria die gefährdetste Altersgruppe.^{5,9} Das bedeutet, dass etwa alle 2 Minuten ein Kind durch Malaria stirbt. Obwohl die afrikanische WHO-Region die stärkste absolute Reduktion der durch Malaria bedingten Todesfälle verzeichnen kann, verteilen sich 85% aller Todesfälle noch immer auf etwa 19 dieser Länder sowie zusätzlich Indien.⁵ Des Weiteren fordert auch der sozioökonomische Einfluss der Malaria, welcher in einer geringen wirtschaftlichen Wachstumsrate und einer erhöhten Armut in Malaria-Endemiegebieten resultiert, ein weiteres Handeln gegen die Ausbreitung der Krankheit.¹⁰

1.2 Die Erreger der Malaria

Malaria wird von protozoischen Parasiten der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen, die den Apicomplexa zugeordnet werden. Es gibt fünf humanpathogene Erreger, die sich stark in ihrem Krankheitsverlauf unterscheiden. Hierzu gehören *P. vivax*, *P. ovale*, welcher zusätzlich in die zwei sympatrischen Spezies *wallikeri* und *curtisi* unterteilt wird, *P. malariae*, *P. knowlesi* und *P. falciparum*.¹¹

P. falciparum ist der gefährlichste der Erreger. Im Jahr 2018 wurden diesem Parasiten 99.7% aller Infektionsfälle in der afrikanischen WHO-Region zugeschrieben.⁵ Der Name *Plasmodium* kommt aus der Botanik und stellt bei Schleimpilzen eine vielkernige Zytoplasmamasse dar. Trotz der unpassenden Bezeichnung hat sie sich dennoch etabliert. *Falciparum* leitet sich aus dem Lateinischen von *falci* = *falx/falcis* („Sichel“) ab. *Par* bedeutet so viel wie „ähnlich“. Das Epitheton *falciparum* weist auf die sichelförmige Gestalt der Gametozyten hin.¹²

Neben hohen Parasitämien von bis zu 31%¹³ greifen bei *P. falciparum* gefährliche Pathomechanismen ineinander, die besonders in der Schwangerschaft oder bei Kindern unter fünf Jahren häufig tödlich verlaufen. Kinder über sechs Monate sind zusätzlich bedroht, da der mütterliche Schutz in Form von Antikörpern nachlässt, obwohl ihr eigenes Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist.¹¹ Neben Fieber treten auch weitere unspezifische Symptome wie Übelkeit, Muskel- und Kopfschmerzen auf.¹⁴ Komplizierte Verläufe durch *P. falciparum* sind bei Kindern häufig mit Anämien und Hypoglykämien verbunden. Erwachsene erleiden vermehrt Lungenödeme, Leber- und Nierenversagen. Komatöse Zustände bei der zerebralen Malaria und Azidosen hingegen betreffen alle Altersgruppen gleichermaßen.¹⁵

Die hohen Parasitämien sind u.a. auf den Befall von Erythrozyten aller Entwicklungsstadien durch den Parasiten zurückzuführen. Andere Erreger, wie z. B. *P. vivax* oder *P. malariae*, befallen bevorzugt junge, unreife Erythrozyten, sog. Retikulozyten, respektiv ältere Erythrozyten.^{13,16} Ein weiterer Bestandteil des Pathomechanismus von *P. falciparum* sind die auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten exprimierten PfEMP1-Proteine (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1).¹⁷ Diese binden an endotheliale Zellstrukturen, wie z. B. an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*)¹⁸, CD36 (*cluster of differentiation 36*)¹⁹, VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule 1*)²⁰, TSP (Thrombospondin)²¹, dem EPCR (*endothelial protein C receptor*)²² oder an CSA (Chondroitinsulfat A)²³. CSA ist vor allem in der Schwangerschaft für die Pathogenese von großer Bedeutung.²⁴ Neben PfEMP1 wurden außerdem noch weitere Oberflächen-Antigene (VSA, *variant surface antigene*) wie STEVOR (*subtelomeric variable open reading frame*)²⁵ oder RIFIN (*repetitive interspersed family*)²⁶ identifiziert.

Durch die Affinität dieser Oberflächenstrukturen zu Endothelzellen kommt es zur Ablagerung infizierter Erythrozyten in Gefäßen. Dies führt in Folge zu Mikrozirkulationsstörungen in einer Vielzahl an Organen.²⁷ Durch die Ablagerungen in den Gefäßen entgeht der Parasit zusätzlich der Aussonderung durch die Milz.²⁸ Des Weiteren konnten Interaktionen infizierter und nicht infizierter Erythrozyten (Rosettenbildung) sowie zwischen nicht infizierten Erythrozyten (Autoagglutination) beobachtet werden.^{29–31} Dies führt zu einer Unterversorgung der Gefäße, die durch Aggregate von infizierten Erythrozyten und Plättchenfaktoren verstärkt wird.³² Darüber hinaus trägt der Wechsel der exprimierten *var*-Gene, die für *PfEMP-1* kodieren, zu einer antigenen Variabilität bei.³³

Der zweithäufigste Erreger ist *P. vivax*, welcher jedoch lediglich 3.3% aller Infektionen verursacht. *P. vivax* und *P. falciparum* sind vergleichbar prävalent in Südostasien und der westlichen Pazifik-Region. In Südamerika entfallen allerdings 75% aller Infektionen auf *P. vivax*.⁵ Die anderen drei Spezies sind aufgrund ihrer geringen Anzahl an Infektionsfällen zwar eher von untergeordneter Bedeutung. Dennoch sind sie teilweise in ihrem Krankheitsverlauf nicht zu unterschätzen.³⁴

1.3 Vektoren

Die Parasiten werden durch Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen. Das Wort *Anopheles* kommt aus dem Altgriechischen und bedeutet so viel wie „schädlich“.³⁵ Weltweit sind mehr als 400 verschiedene *Anopheles*-Spezies verbreitet³⁶, wovon etwa 70 den Parasiten auf den Menschen übertragen können.³⁷ Hiervon sind etwa 40 für den Großteil der Infektionen verantwortlich.³⁶ Die Übertragung der Malaria ist stark von der Vektor-Spezies abhängig.³⁶ Vor allem *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.), *An. arabiensis* und *An. funestus* tragen zu der hohen Malaria-Belastung in Afrika bei.³⁸ Der Parasit benötigt 7 - 10 Tage für die Entwicklung in der Mücke. Die Lebenszeit der Mücken ist wiederum von äußeren Umgebungsbedingungen wie der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur abhängig. Das tropische Klima in Afrika sowie die hohe anthropophile Präferenz der Vektoren sind neben anderen Faktoren ursächlich für die hohe Malariabelastung in Afrika.³⁶ Eine der Hauptsäulen in der Malariabekämpfung ist dementsprechend die Eindämmung der Mücken mit Hilfe von insektizidimprägnierten Netzen (ITN, *insecticide-treated mosquito net*), das Versprühen von Insektizidsprays in Wohnräumen (IRS, *indoor residual spraying*) und die Verwendung von langlebigen Insektizidnetzen (LLIN, *long-lasting insecticidal net*).³⁶ Letztere werden bereits bei der Herstellung mit Insektiziden behandelt und können etwa drei Jahre genutzt werden.³⁹

1.4 Lebenszyklus der Parasiten

Die Parasiten vollziehen einen komplexen Lebenszyklus, bei dem der Mensch den Zwischenwirt darstellt. In ihm findet die asexuelle Vermehrung, die sog. Schizogonie, statt.

Die als Sporogonie bezeichnete sexuelle Vermehrungsphase erfolgt in der Mücke. Durch den Stich der weiblichen *Anopheles*-Mücke gelangen die infektiösen Stadien des Erregers in Form der Sporozoiten über die Blutbahn in die Leber (Abbildung 1-1, **A**). Dort befallen sie Hepatozyten und entwickeln sich asexuell zu Leberschizonten (Abbildung 1-1, **B**). Diese Vermehrungsphase wird auch exoerythrozytäre Schizogonie genannt und ist je nach Erregerart unterschiedlich lang. In Folge der Abschnürung von Merosomen gelangen Tausende Merozoiten in die Blutbahn und die infizierten Leberzellen sterben ab (Abbildung 1-1, **C**). Merosome sind Membran-umhüllte Strukturen, die die Merozoiten beinhalten. Merozoiten stellen die ungeschlechtliche Form der Parasiten dar, die durch Teilung der Schizonten entstanden sind. Erreger von *P. vivax* und *P. ovale* können als Hypnozoiten in der Leber verweilen und später zu Rezidiven führen. Im Blut dringen die Merozoiten je nach Erregerart in unterschiedliche Stadien von roten Blutkörperchen ein (Abbildung 1-1, **D**). Hier entwickeln sie sich über Ringstadien zu metabolisch hoch aktiven Trophozoiten. Diese wachsen zum Schizontenstadium heran, welches in Folge der asexuellen Replikation und anschließender Zellteilung je nach Erregerart unterschiedlich viele Merozoiten enthält. In dieser erythrozytären Schizogonie gelangen die Merozoiten durch Ruptur der roten Blutkörperchen wieder in die Blutbahn und können neue Erythrozyten befallen (Abbildung 1-1, **E**). Diese Bildung und Freigabe von Merozoiten kann je nach Erregerart rhythmisch verlaufen und ergibt das typische Bild des Wechselfiebers. Bei *P. knowlesi* ist die Dauer des Zyklusses mit 24 h auffallend kurz.⁴⁰ Bei *P. vivax* und *P. ovale* verläuft er synchron und dauert etwa 48 h, weshalb die Krankheit Malaria tertiana genannt wird. Auch bei *P. falciparum* dauert dieser Zyklus etwa 48 h, jedoch verläuft er hier asynchron. Die Krankheit wird Malaria tropica genannt. Die Malaria quartana wird von *P. malariae* verursacht. Hier beansprucht der Zyklus ca. 72 h.⁴¹ Einige Merozoiten entwickeln sich in Folge der Gametozytogenese zu Keimzellen, den sog. Gametozyten. Bei einem erneuten Stich werden diese von der Mücke aufgenommen (Abbildung 1-1, **F**). Aus dem männlichen Gametozyt entstehen acht Mikrogameten und der weibliche Gametozyt reift zum Makrogamet heran (Abbildung 1-1, **G**). Im Darm der Mücke fusionieren Mikro- und Makrogamet zur Zygote (Abbildung 1-1, **H**), welche sich in Folge von Reduktionsteilungen zum Ookinet (Abbildung 1-1, **I**) entwickelt. Der Ookinet ist motil und wandert zum Mitteldarmepithel, wo dann die Oozyste entsteht (Abbildung 1-1, **J**). Diese bringt erneut Sporozoiten hervor, die über einen Hohlraum im Moskito, dem Hämozöl, in Folge der Ruptur der Oozyste in die Speicheldrüsen der Mücke wandern (Abbildung 1-1, **K**). Durch einen erneuten Mückenstich können sie wieder übertragen werden (Abbildung 1-1, **A**).^{14,42}

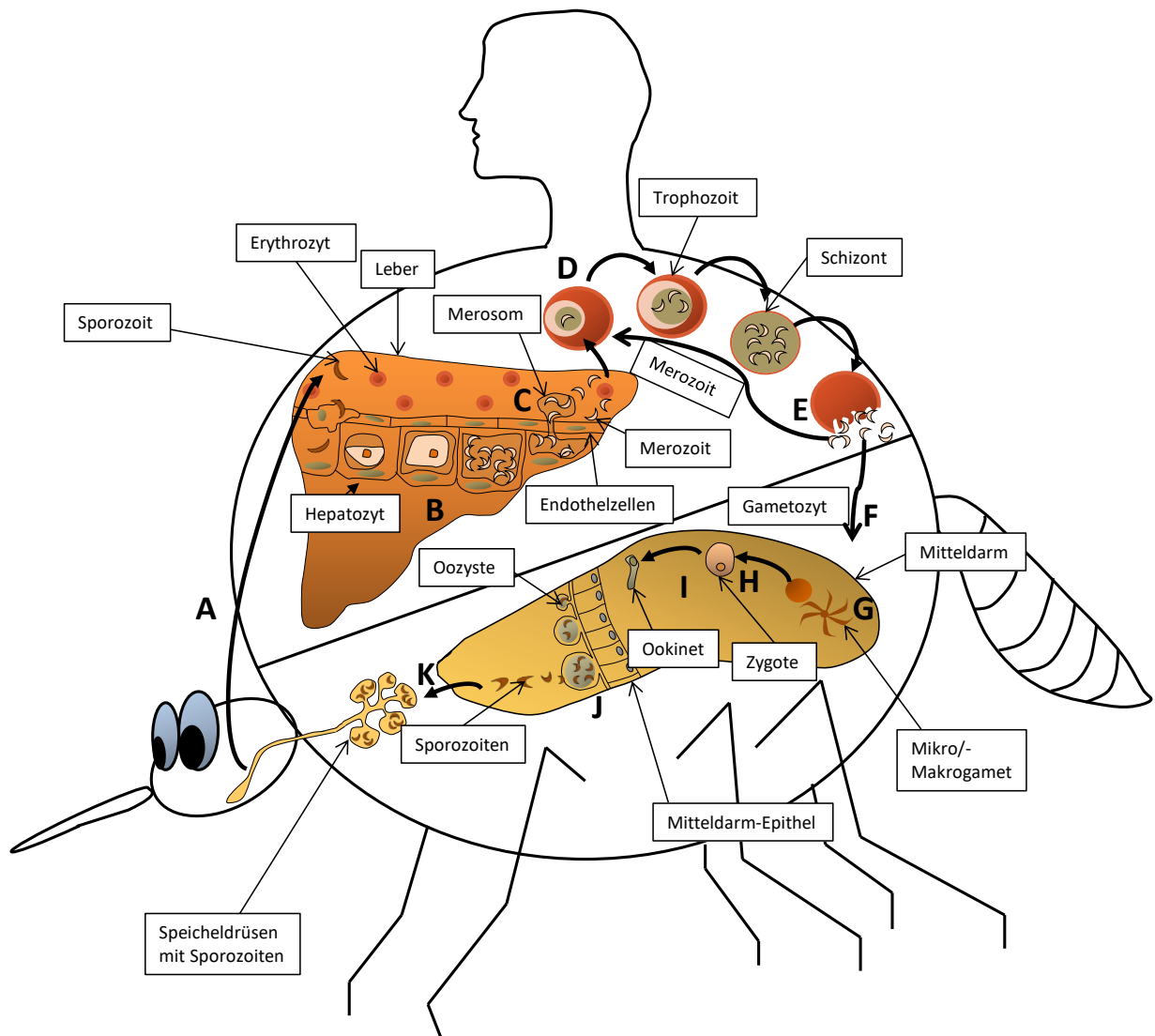


Abbildung 1-1: Der parasitäre Entwicklungszyklus modifiziert nach COWMAN *et al.*¹⁴ Infolge des Sticks der *Anopheles*-Mücke werden die Parasiten übertragen (A). Nach einem initialen Leberzellstadium (B) befallen die Merozoiten rote Blutkörperchen (C, D). Durch Ruptur der Erythrozyten entsteht das typische Bild des Wechselfiebers und neue Erythrozyten können befallen werden (E). Gametozyten können bei einem erneuten Stich wieder in die Mücke aufgenommen werden, in welcher der sexuelle Zyklus vollzogen wird (F-J). Hieraus entstehen wiederum infektiöse Stadien des Parasiten, die in der Speicheldrüse der Mücke bis zum erneuten Stich verweilen (K).

1.5 Abwehr- und Therapieoptionen

Die Abwehr- und Therapieempfehlungen der WHO gegen Malaria sind aufgrund jahrelanger Forschungen und möglicher Optionen sehr vielfältig. Zur Abwehr der Infektion und Gewährleistung eines effektiven Schutzes wird durch chemopräventive Kampagnen versucht, gezielt Bevölkerungsgruppen vor den Parasiten zu schützen.

So werden verschiedene Wirkstoffkombinationen z. B. für die saisonale Malaria-Chemoprävention (SMC, *seasonal Malaria chemoprevention*) und für die intermittierende präventive Behandlung für Kinder und Schwangere (*intermittent preventive treatment for children (IPTi)/ in pregnancy (IPTp)*) empfohlen.⁵ Ebenfalls werden therapeutische Antimalaria-Dosen an gesamte Bevölkerungsgruppen (*mass drug administration (MDA)*) verabreicht, ohne zuvor auf eine Infektion getestet zu haben.⁴³ Trotz erfolgreicher Umsetzungen ist eine Belastung vieler gesunder Menschen mit diesen Arzneimitteln zu beachten, sodass insbesondere der Abwehr der Mücken im Voraus eine essenzielle Rolle zukommt.

1.5.1 Abwehr der Insekten

Derzeitig von der WHO empfohlene Insektizide gegen *Anopheles*-Mücken können in vier große Klassen unterteilt werden: Pyrethroide, Carbamate, Organophosphate und Organochloride wie das DDT.⁵ Pyrethroide, synthetisch abgeleitet vom natürlichen Insektizid Pyrethrum⁴⁴, und DDT sind Insektizide, die u.a. spannungsabhängige Natriumkanäle blockieren.^{45–47} Organophosphate und Carbamate hemmen irreversibel die Acetylcholinesterase.⁴⁸

Resistenzen gegen all diese Verbindungen sind schon seit langem bekannt.⁴⁹ Ursächliche Mechanismen, wie die metabolische Detoxifizierung durch eine erhöhte Bildung abbauender Enzyme, eine verringerte Sensitivität des Target-Proteins und Mutationen proteinkodierender Gene wurden nachgewiesen.⁵⁰ Piperonylbutoxid (PBO), welches abbauende Enzyme der Insekten hemmt⁴⁴, wird dementsprechend von der WHO synergistisch zu Pyrethroiden in resistenzstarken Gebieten empfohlen.³⁶

Alle vier Klassen der Insektizide werden, mit Fokus auf die Pyrethroide, aufgrund fehlender Alternativen zur Vektorkontrolle verwendet. Durch die WHO präqualifizierte Pyrethroid-LLINs oder Pyrethroid-PBO-ITNs in resistenzstarken Gebieten werden neben dem IRS als Kernmaßnahmen gegen Malaria empfohlen. Für das IRS soll DDT, welches nicht von der WHO präqualifiziert wurde, nur in Ausnahmefällen und bei fehlenden Alternativen eingesetzt werden. Bei Verwendung von zwei verschiedenen Vektorkontrollmaßnahmen sollen zur Vermeidung von Resistenzen unterschiedliche Insektizidklassen eingesetzt werden.³⁶ Gemäß der WHO wurden im Jahr 2018 immerhin etwa 50% der Bevölkerung durch Verwendung von ITNs geschützt.⁵

Neben dem verbreiteten Einsatz von Insektiziden sind Larvazide⁵¹ oder die Trockenlegung der Brutstätten der Mückenlarven weitere Möglichkeiten⁵², die Parasitenlast zu reduzieren. Auch die Verwendung von Endektoziden wie Ivermectin ist denkbar. Hierdurch sterben die Mücken nach einer Blutmahlzeit von Personen, die diese Arzneimittel eingenommen haben, ab oder weisen eine erheblich verkürzte Lebensspanne auf.^{53,54}

Fortschreitende Resistenzentwicklungen gegen Insektizide führten außerdem zu neuen Forschungsgebieten, in denen zwecks Begrenzung der Verbreitung der Insekten sterile Tochtergenerationen der Mücken etabliert werden.^{55,56} Weitere Studien sind hier allerdings nötig, um die Wirksamkeit, das Sicherheitsprofil und das Ausmaß dieser Interventionen zu untersuchen.

1.5.2 Immunisierung

Neben der Vektorkontrolle steht seit Juli 2015 mit RTS,S/AS01 (Handelsname: Mosquirix) der erste Impfstoff gegen Malaria zur Verfügung, welcher von der *European Medicines Agency* (EMA) positiv für Kinder zwischen 6 Wochen und 17 Monaten bewertet wurde.⁵⁷ Neben dem von *P. falciparum* abgeleiteten Circumsporozoiten-Protein (CSP) ist ein Hepatitis B-Oberflächenantigen mit Liposomen basierten Adjuvantien inkludiert, welches zur Aktivierung des Immunsystems führen soll.⁵⁸ Erste Ergebnisse konnten allerdings nur eine begrenzte und mit der Zeit abnehmende Wirkung belegen. So konnte bei Kleinkindern zwischen sechs bis 12 Wochen lediglich eine Wirksamkeit von 25.9% nach der vierten Dosis detektiert werden. Bei Kindern zwischen fünf bis 17 Monaten lag die Wirksamkeit immerhin bei 36.3% nach vier Dosen.⁵⁹ Mit Hilfe von Pilotprojekten in Malawi, Ghana und Kenia seit April bzw. September 2019 soll eine Bewertungsgrundlage für eine mögliche Empfehlung der WHO geschaffen werden.⁶⁰

1.5.3 Antimalaria-Therapeutika

Zur Therapie der Malaria stehen verschiedene Wirkstoffklassen zur Verfügung. Hierzu gehören Arylaminoalkohole, 4-Aminochinoline, Antifolate und Sulfonamide, Naphthochinone, 8-Aminochinoline, Artemisinine und Antibiotika, von denen insgesamt 14 Wirkstoffe zur Therapie auf der *WHO Model Lists of Essential Medicines* vertreten sind.⁶¹

1.5.3.1 Arylaminoalkohole

Chinin (**1**), Mefloquin (**2**), Lumefantrin (**3**) und Halofantrin (**4**) sind Arylaminoalkohole (Abbildung 1-2). Chinin gilt als eines der ersten Mittel, das gegen Malaria eingesetzt wurde. Bereits 1820 konnte es als reines Alkaloid aus der Rinde des Chinarindenbaums (*Cinchona pubescens*) isoliert werden.⁶² Obwohl STORK *et al.* 2001 die stereoselektive Totalsynthese von **1** gelang⁶³, stellt die Extraktion des Chinins aus der Chinarinde immer noch das effizienteste Verfahren für dessen Gewinnung dar.⁶² Aufgrund seiner geringen Wirksamkeit und zahlreicher Nebenwirkungen, wie Hypoglykämien in der Spätschwangerschaft, wird es heute lediglich im ersten Trimenon der Schwangerschaft bei der unkomplizierten Malaria tropica in Verbindung mit Clindamycin eingesetzt. Des Weiteren wird es bei der komplizierten Malaria tropica genutzt, wenn sowohl Artesunat als auch Artemether nicht zur Verfügung stehen.⁶⁴ Vielzählige Resistenzen gegen **1** beruhen auf Polymorphismen verschiedener Gene, wie dem *Pfmdr1* (*multidrug resistance 1*)-, *Pfcr1* (*chloroquin resistance transporter*)- und *Pfnhe1* (*sodium/hydrogen exchanger 1*)-Gen.⁶⁵

Kreuzresistenzen gegen Wirkstoffe dieser Substanzklasse konnten ebenso nachgewiesen werden.⁶⁶ Somit werden **2** und **3** lediglich als Kombinationspartner bei der Artemisinin-Kombinationstherapie (ACT, *artemisinin-based combination therapy*) eingesetzt, in der ein kurzwirksames Artemisinin-Derivat mit langwirksamen Wirkstoffen kombiniert wird, um Resistenzen vorzubeugen.⁶⁴ Aufgrund neuropsychiatrischer Nebenwirkungen ist die Einnahme von **2** jedoch abzuwägen.⁶⁷ **4** wird aufgrund des kardiotoxischen Potentials nicht mehr zur Therapie empfohlen.⁶⁸

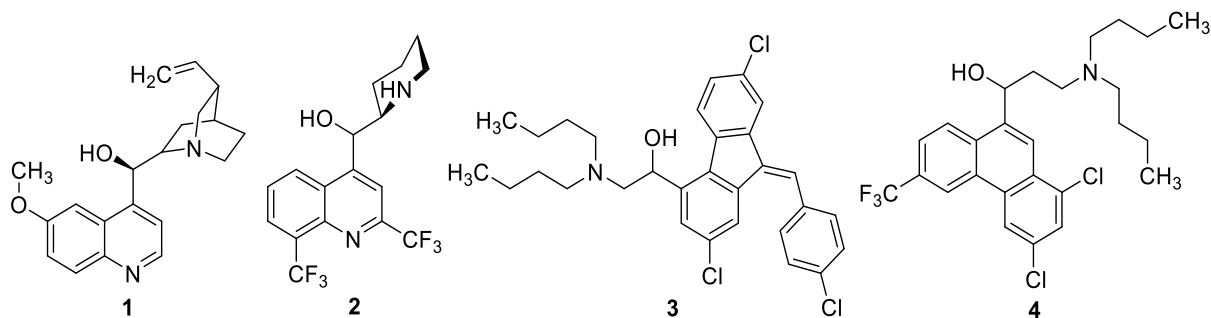


Abbildung 1-2: Arylaminoalkohole: Chinin (**1**), Mefloquin (**2**), Lumefantrin (**3**), Halofantrin (**4**).

1.5.3.2 4-Aminochinoline

Zu den 4-Aminochinolinen gehört das Chloroquin (**5**, Abbildung 1-3), welches neben der ACT von der WHO für unkomplizierte Infektionen bei Chloroquin-empfindlichen *P. vivax*-, *P. ovale*-, *P. malariae*- oder *P. knowlesi*-Erregern empfohlen wird.⁶⁴ *P. falciparum* hat bereits Resistenzen gegenüber **5** entwickelt, was mit der späten Gametogenese des Parasiten sowie dessen Unempfindlichkeit gegenüber schizontozidalen Arzneimitteln erklärt wird, wodurch Resistenzen schnell verbreitet werden.⁶⁹ Chloroquin verhindert durch Interaktion mit Ferriprotoporphyrin IX des Häms und der Hemmung der Hämpolymerase die Hämazoin-Bildung.⁷⁰⁻⁷² Zusätzlich wird eine Glutathion-abhängige Hemmung der Häm-Zersetzung im Zytoplasma diskutiert.⁷³ Chloroquin ist gut verträglich und kostengünstig, jedoch vermehren sich auch bei nicht-*falciparum*-Erregern Meldungen über Resistenzbildungen.⁷⁴ Neben Mutationen des *PfCR*-Transporters (*PfCRT*, *P. falciparum chloroquine resistance transporter*), welcher sich in der Membran der parasitophoren Nahrungsvakuole befindet und Wirkstoffe effluxiert, konnte auch bei *P. vivax* ein homologer *PfCR*-Transporter gefunden werden, der jedoch nicht ursächlich für die Chloroquin-Resistenz dieses Parasiten zu sein scheint.⁷⁵ Des Weiteren wurde die Mutation des *Pfmdr1*-Gens (*Plasmodium falciparum multidrug resistance 1*) identifiziert, welches das *PfMDR1*-Protein kodiert.⁷⁶ Dieses ist ein transmembranes P-Glykoprotein (*PGH1*, *P-glycoprotein homologue 1*), welches einen ATP-abhängigen ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) in Form einer Efflux-Pumpe darstellt.⁷⁷

Mutationen auf diesem Gen sind auch verantwortlich für die Resistenzen gegen Mefloquin, Chinin⁷⁸, Amodiaquin⁷⁹, Lumefantrin⁸⁰, und Artemisininen wie Artesunat⁸¹. Obwohl bei dem Analogon Amodiaquin (**6**, Abbildung 1-3) unerwünschte Wirkungen wie Agranulozytose⁸² und Hepatitis⁸³ bekannt sind, wird es von der WHO aufgrund seiner hoch effektiven Wirkung vor allem in Kombination mit anderen Wirkstoffen zur Behandlung der unkomplizierten Malaria trotzdem noch in Entwicklungsländern gegen Chloroquin-resistente Stämme empfohlen.⁶⁴ Nach Applikation wird es schnell in das biologisch aktive Desethylamodiaquin metabolisiert.⁸⁴ Piperaquin (**7**, Abbildung 1-3) stellt ein Bis-4-aminochinolin dar und wird in Kombination mit Dihydroartemisinin von der WHO empfohlen.⁶⁴ Aufgrund der sterisch anspruchsvollen Struktur ist **7** nicht für den Efflux-Transporter geeignet⁶⁴, wodurch die Wirksamkeit gegen Chloroquin-resistente Stämme erklärt wird.⁸⁵ Das strukturverwandte Naphthyridin-Derivat Pyronaridin (**8**) wird aufgrund synergistischer Effekte nur in Kombination mit Artesunat genutzt.^{64,86,87} Da *P. falciparum* mittlerweile auch gegen diesen Wirkstoff Resistenzen entwickelt hat⁸⁸ und **8** potenziell hepatotoxisch ist⁸⁹, wartet die WHO weitere Studien zur Sicherheit des Wirkstoffs ab.⁶⁴

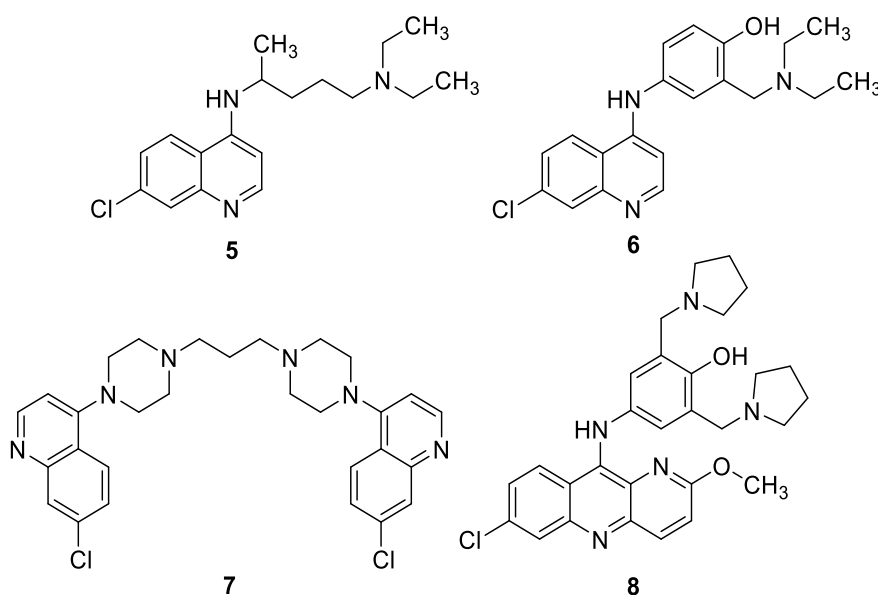


Abbildung 1-3: 4-Aminochinolone: Chloroquin (**5**), Amodiaquin (**6**), Piperaquin (**7**) und Pyronaridin (**8**).

1.5.3.3 Antifolate

Die Biguanide Proguanil (**9**), Chlorproguanil (**11**) und das später entwickelte Diaminopyrimidin Pyrimethamin (**12**) ebenso wie das Sulfonamid Sulfadoxin (**13**) und das Sulfon Dapson (**14**) greifen in den Folsäurestoffwechsel des Parasiten ein (Abbildung 1-4).

Sulfonamide und Sulfone sind Strukturanaloga der *p*-Aminobenzoesäure und hemmen kompetitiv die Dihydropteroat-Synthase (DHPS) und stellen Klasse I-Antifolate dar. **9** und **11** werden zu aktiven zyklischen Triazinen (vgl. **10**) metabolisiert und hemmen ebenso wie Pyrimethamin die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und folglich die Tetrahydrofolsäurebildung. Damit greifen sie synergistisch in die Folsäuresynthese ein und werden zu den Klasse II-Antifolaten gezählt.⁹⁰ Sowohl humane als auch plasmodiale Zellen sind eukaryotisch. Eine erhöhte Bindungsaffinität der Antifolate für die parasitäre DHPS ist bislang nicht hinreichend bekannt.⁹⁰

Von der WHO wird die Wirkstoffkombination Sulfadoxin/Pyrimethamin (Handelsname: Fansidar) in Verbindung mit Artesunat bei der unkomplizierten Malaria tropica empfohlen. Daneben findet die Kombination präventiv Anwendung in der Schwangerschaft oder in bestimmten Regionen bei Kindern.⁶⁴ Beide Wirkstoffe haben eine Halbwertszeit von über 90 h und eignen sich somit für die ACT.⁹¹ Allerdings gefährden schnelle Resistenzbildungen durch Punktmutationen der plasmodialen DHFR- und DHPS-Gene sowie gravierende unerwünschte Wirkungen wie das Stevens-Johnsons-Syndrom ihren Einsatz.^{92–94}

9 bzw. **11** werden in einer Cytochrom 2C19-abhängigen Reaktion zu zyklischen Triazin-Derivaten (z. B. **10**) metabolisiert, welche inhibitorische DHFR-Aktivität aufweisen. Um Resistenzen zu verhindern wird die Wirkstoffkombination **9** mit Atovaquon zur Prophylaxe für Reisende (Handelsname: Malarone) oder für den Fall nicht zur Verfügung stehender Leitlinientherapeutika zur Therapie der unkomplizierten Malaria empfohlen.⁶⁴ Außerdem konnte eine erhöhte Aktivität von Atovaquon durch Proguanil festgestellt werden.^{95,96} Im Gegenteil hierzu konnten bei Chinolin-Derivaten oder Artemisininen antagonistische Effekte mit Atovaquon beobachtet werden.⁹⁵ **9** gehört in Verbindung mit Chloroquin (**5**) zu den von der WHO definierten essenziellen Wirkstoffen.⁶¹

11 in Kombination mit Dapson (**14**) (Handelsname: Lapdap) wurde aufgrund schwerer Hämolysen, vor allem bei Patienten mit G6PD-Mangel, 2008 vom Markt genommen.⁹⁷

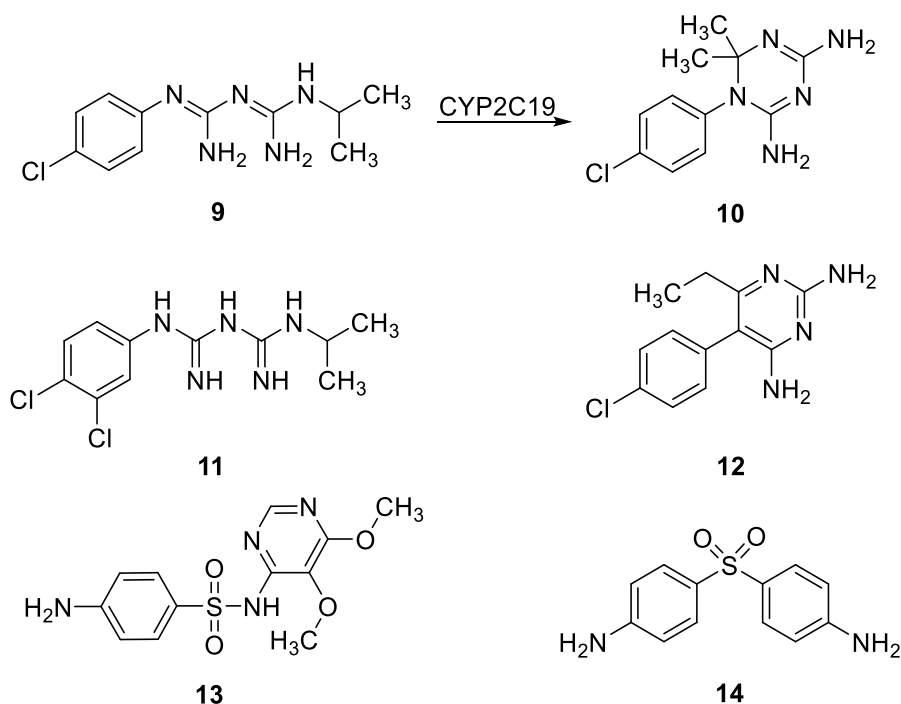


Abbildung 1-4: Antifolate sowie Metabolisierung von **9**: Proguanil (**9**), Chlorproguanil (**11**), Pyrimethamin (**12**), Sulfadoxin (**13**) und Dapson (**14**).

1.5.3.4 Naphthochinone

Das Hydroxynaphthochinon Atovaquon (**15**, Abbildung 1-5) hemmt als Analogon des Ubichinons den plasmodialen Cytochrom bc1-Reduktase-Komplex der mitochondrialen Atmungskette.⁹⁸ Eine Mutation des Cytochrom b-Gens ist jedoch für die schnelle Resistenzentwicklung gegen **15** verantwortlich.^{99,100} Aus diesem Grund wird es mit Proguanil kombiniert, welches zudem synergistische Effekte aufzeigt.⁹⁵ Interessanterweise konnte in Verbindung mit Cycloguanil eine gering antagonistische Wirkung beobachtet werden. Der genaue Wirkmechanismus ist hierbei noch ungeklärt. Es wird jedoch von einem Folsäure-Stoffwechsel-unabhängigen Wirkmechanismus ausgegangen.¹⁰¹ In Kombination mit Proguanil wird es als Chemoprophylaxe und zur Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica bei Reisenden empfohlen. Zusätzlich wird es, falls keine Leitlinien-Therapeutika zu Verfügung stehen, in Kombination mit Artesunat und Primaquin zur Behandlung der unkomplizierten Malaria genutzt.⁶⁴

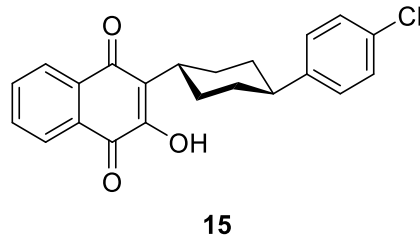


Abbildung 1-5: Atovaquon (**15**).

1.5.3.5 8-Aminochinoline

Neben dem lang bewährten Primaquin (**16**) wurde im Juli 2018 auch Tafenoquin (**17**) von der FDA zur Prophylaxe bei Erwachsenen und zur Therapie von *P. vivax*-Infektionen bei über 16-Jährigen zugelassen.¹⁰²

Trotz Vorteilen wie einer langen Halbwertszeit von etwa zwei Wochen¹⁰³, einer effektiveren Wirksamkeit gegen Blut- und Leberschizonten *in vitro*¹⁰⁴ und einer blutschizontoziden Wirkung auch gegen *P. falciparum*-Erreger^{104,105}, ist **17** ebenso wie Primaquin nicht bei Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PDH-Mangel) indiziert.¹⁰⁶ Ein G6PDH-Mangel ist in einem genetischen Polymorphismus begründet, der in vielen Regionen Afrikas verbreitet ist¹⁰⁷ und zu verstärkten toxischen Hämolysen unter einer 8-Aminochinolin-Therapie führen kann.¹⁰⁸ Es wurde gezeigt, dass die afrikanische A(-)-heterozygote Variante des G6PDH-Polymorphismus einen erhöhten Schutz gegen letale *P. falciparum*-Krankheitsverläufe bietet, wodurch die hohe Prävalenz in Afrika erklärt werden kann.¹⁰⁹ Sowohl für Primaquin¹¹⁰ als auch für Tafenoquin¹¹¹ ist die metabolische Aktivierung durch CYP2D6 notwendig. Primaquin wird zur Rezidivprophylaxe und Therapie bei *P. vivax*- und *P. ovale*-Infektionen von der WHO empfohlen. Ausgenommen sind Schwangere oder Stillende, Kinder unter sechs Monaten oder G6PDH-defiziente Personen (Favismus). Auch wird es aufgrund der gametozyidalen Wirkung bei *P. falciparum*-Infektionen empfohlen, um eine Übertragung der Gametozyten auf den Moskito zu unterbinden.⁶⁴

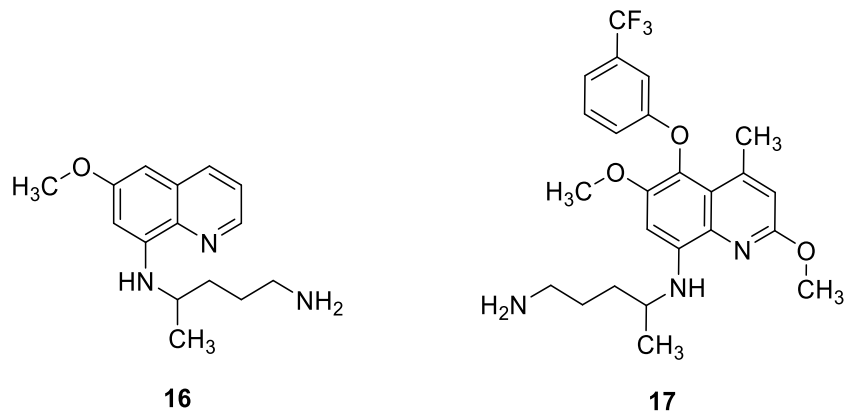


Abbildung 1-6: 8-Aminochinoline: Primaquin (**16**) und Tafenoquin (**17**).

1.5.3.6 Antibiotika

Doxycyclin (**18**) und Clindamycin (**19**) sind in Deutschland vor allem als klassische Antibiotika gegen Bakterien bekannt (Abbildung 1-7). **18** wird von der WHO zur Prophylaxe oder in Kombination mit Chinin oder Artesunat zur Nachbehandlung bei komplizierten Infektionen der Malaria oder zur Behandlung der unkomplizierten Malaria empfohlen, sofern keine Artemisinine zur Verfügung stehen.⁶⁴ Es konnte gezeigt werden, dass die Expression apicoplastärer Gene blockiert wird, woraus nicht-funktionale Apicoplasten in den Tochterparasiten resultieren. Der Apicoplast ist eine selbstreplizierende Organelle prokaryotischen Ursprungs mit metabolischen Aufgaben. Der Verlust des Apicoplasten erfolgt erst in der Folge-Generation, wodurch der langsame Wirkeintritt dieser Arzneimittel bei der Malaria erklärt werden kann.¹¹² In einer Proteom-Analyse wurde die Deregulation metabolisch aktiver Proteine im Apicoplasten nachgewiesen.¹¹³ Da **18** für Kinder und Schwangere aufgrund bekannter Einlagerungen in Zähne und Knochen kontraindiziert ist, hat sich als Alternative Clindamycin (**19**) herausgestellt. Dieses Lincosamid-Antibiotikum bindet an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und inhibiert dadurch die Initialisierung der Peptidkettenbildung in der parasitären Proteinbiosynthese.⁶⁴ Es wird in Kombination mit Chinin bei unkomplizierten *P. falciparum*-Infektionen im ersten Trimenon von der WHO empfohlen.⁶⁴

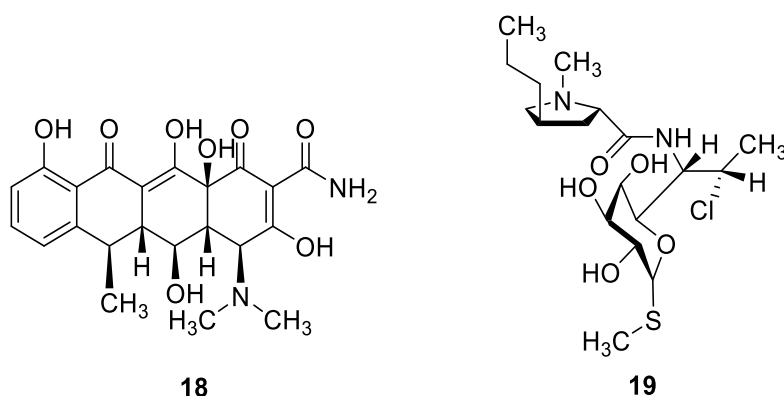


Abbildung 1-7: Für die Malariatherapie genutzte Antibiotika: Doxycyclin (**18**) und Clindamycin (**19**).

1.5.3.7 Artemisinine

Die Artemisinin-Kombinationstherapie bildet seit 2001 den von der WHO empfohlenen Goldstandard in der Therapie der unkomplizierten Malaria tropica.^{64,114} Das natürlich vorkommende Artemisinin (**20**, Abbildung 1-8) wurde 1971 von der Chinesin Youyou aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) isoliert, wofür sie 2015 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie erhielt.¹¹⁵ Dihydroartemisinin (DHA, **21**), Artemether (**22**), Arteether (**23**) und Artesunat (**24**) sind halbsynthetisch hergestellte Derivate mit modifizierten pharmakokinetischen Eigenschaften, da **20** sowohl in Wasser, als auch in Öl unlöslich ist (Abbildung 1-8).¹¹⁶ Sie stellen hoch aktive, schnell wirksame Verbindungen dar. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit werden Artemisinine mit lang wirksamen Arzneistoffen kombiniert, um Resistenzen vorzubeugen.¹¹⁷ Von der WHO werden derzeit fünf Wirkstoffkombinationen für die Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica empfohlen (Tabelle 1-1).⁶⁴

Tabelle 1-1: Übersicht über die von der WHO empfohlenen Artemisinin-Kombinationstherapien zur Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica.

Artemisininderivat	Kombinationswirkstoff	Handelsname
Artesunat	Mefloquin	ASMQ
Artesunat	Amodiaquin	ASAQ
Artesunat	Sulfadoxin-Pyrimethamin	
Artemether	Lumefantrin	Coartem, Coartem Dispersible, Riamet, u.a.
Dihydroartemisinin	Piperaquin	DuoCotecxin, Artekin, Eurartesim u.a.

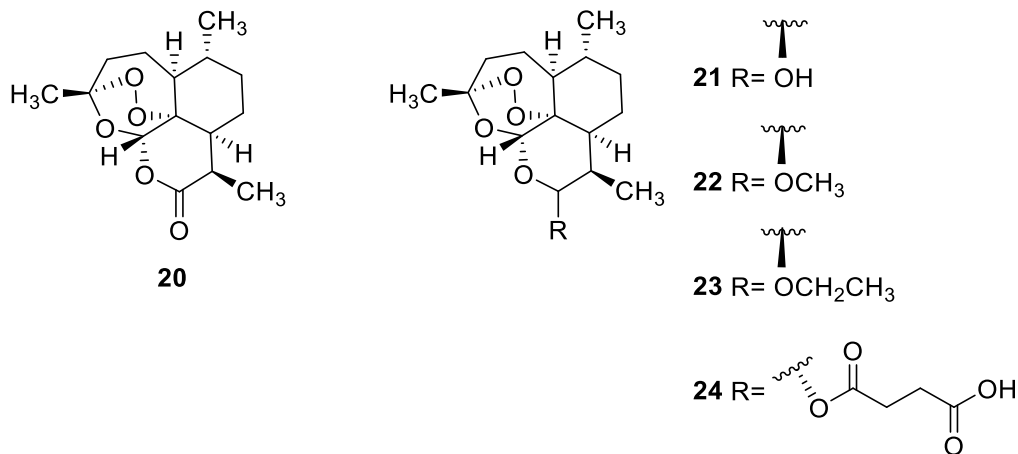


Abbildung 1-8: Artemisinin (**20**) und Derivate: Dihydroartemisinin (**21**), Artemether (**22**), Arteether (**23**) und Artesunat (**24**).

Darüber hinaus wird **24** intravenös oder intramuskulär in allen Altersgruppen bei komplizierten Verläufen der Malaria tropica empfohlen.⁶⁴ **21** wurde als aktiver Metabolit von **22**, **23** und **24** detektiert. Vor allem Artesunat (**24**) zeigt eine schnelle Umwandlung zu **21**, was durch ubiquitäre Plasma-Esterasen anstelle einer hepatischen Metabolisierung erklärt wird.¹¹⁸ Artemisinine limitieren sowohl die asexuellen als auch die sexuellen Stadien des Parasiten.^{119,120} Der Wirkmechanismus ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es wird u.a. davon ausgegangen, dass die Peroxidstruktur in Anwesenheit von Häm unter Radikalbildung gespalten wird.¹²¹ Häm wird in den infizierten Erythrozyten durch den Hämoglobin-Verdau in großen Mengen gebildet, wodurch die hohe Selektivität der Artemisinine gegenüber den Parasiten erklärt wird.¹²² Die Radikale können Proteine, Lipide und Membrankomponenten zerstören und so zu folgeschweren zellulären Schäden führen.¹²¹ Auch über eine Inhibition der sarkoplasmatisch/endoplasmatisch retikulären Calcium-Adenosin-Triphosphatase (SERCA) *PfATP6* (*P. falciparum* *Ca*²⁺ transporting ATPase 6), welche einen Calciumtransporter darstellt, wird spekuliert.¹²³ BRIDGFORD *et al.* zeigten außerdem, dass DHA sowohl Proteine schädigt, als auch die parasitäre Proteasom-Funktion beeinträchtigt. Folglich akkumulieren ungefaltete, geschädigte und polyubiquitinierte Proteine, was zu einem erhöhten ER (Endosomales Retikulum)-Stresslevel führt und zu der zellschädigenden Wirkung von **21** beiträgt.¹²⁴ Interessanterweise konnte auch die plasmodiale Phosphatidylinositol-3-kinase (*PfPI3K*) als Target der Artemisinine identifiziert werden.¹²⁵

Anlass zur Sorge bereiten Resistenzmeldungen gegen diese Substanzklasse. Die Resistenzen sind durch eine verlängerte Eliminierungszeit der Parasiten gekennzeichnet.¹²⁶ Bereits 2006 wurden erste Berichte über Therapieversagen unter Artemisininen in West-Kambodscha und Thailand veröffentlicht.^{127–129} Seitdem breiten sich Artemisinin-Resistenzen über Südost-Asien aus.^{43,130–132} Die Resistenzen sind u.a. durch eine Mutation in der „propeller“-Region auf dem *PfKelch13*-Gen begründet.¹³³

1.6 Ausblick auf neue Wirkstoffe

Aufgrund der fortschreitenden Resistenzbildungen gegen Artemisinine sowie bestehende Resistenzen gegen den Großteil der auf dem Markt befindlichen Therapiemöglichkeiten sind neue Wirkstoffe von essenzieller Bedeutung. Seit dem 03. November 1999 unterstützt die *Medicines for Malaria Venture* (MMV), auch durch Partnerschaften mit Universitäten und pharmazeutischen Unternehmen, die Entdeckung, Entwicklung und Bereitstellung neuer Antimalariamittel. Diese Non-Profit-Organisation konnte bisher entscheidende Erfolge zur Malariabekämpfung beitragen.

In den letzten Jahren wurden viele Bestrebungen für die Erforschung neuer Antimalariamedikamente unternommen. Mit Hilfe von Target-basierten oder phänotypischen Screenings konnten neue Leitstrukturen, sog. Hit-Strukturen, identifiziert werden. Im ersten Fall erfolgt die Testung der zu untersuchenden Substanzen an isolierten Zielstrukturen, den sog. Targets, wie z.B. Enzymen. Das Target muss dabei bekannt sein. Mit Hilfe des rationalen Wirkstoffdesigns kann die Hit-Struktur anschließend gezielt optimiert werden. Weitere Targets einer Verbindung bleiben allerdings unentdeckt. Auch können potente und selektive Inhibitoren aufgrund unzureichender pharmakokinetischer Eigenschaften eine ungenügende *in vivo*-Wirksamkeit aufzeigen und somit für weiterführende Studien ausgeschlossen werden. Beim phänotypischen Screening wird dagegen die Inhibition des ganzheitlichen Zell- oder Organismenwachstums untersucht. Strukturen, die auf einem phänotypischen Screening basieren, bieten somit den Vorteil, dass diese bereits auf den Organismus wirken und eine ausreichende Permeabilität aufweisen. Zusätzlich sind beim phänotypischen Screening mehrere Targets eines Wirkstoffs auffindbar.^{134,135} In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch phänotypische Screenings mehr *first-in-class*-Wirkstoffe hervorgebracht wurden als durch Target-basierte Screenings.¹³⁶

Die Anforderungen an neue Antimalariamittel sind aufgrund der Vielzahl und Variabilität der Parasitenstadien und -arten, der schnellen Resistenzbildung der Plasmodien und der Gefährdung aller Alters- und Bevölkerungsgruppen enorm. So sollten neue Wirkstoffe hoch effektiv und zusätzlich wirksam gegen Hypnozoiten sowie bereits resistente Parasiten sein. Zusätzlich sollten sie keine neuen Resistenzbildungen induzieren, nicht toxisch und für alle Bevölkerungsgruppen anwendbar sein.

Optimalerweise sollten die Herstellungskosten gering und der neue Wirkstoff sowohl präventiv als auch therapeutisch einsetzbar sein.^{137,138} Zurzeit werden fünf aus MMV-Projekten hervorgegangene Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen in klinischen Studien evaluiert (Stand: Juni 2020).

Die Wirkstoffkombination Artefenomel (**26**) und Ferroquin (**27**) befindet sich zurzeit in der klinischen Studienphase IIb (Abbildung 1-9). **26** stellt ein synthetisches neuartiges Trioxolan dar, welches sich hinsichtlich des Pharmakophors von den typischen Artemisininen unterscheidet.

Nach Applikation von Artefenomel konnte neben einem schnellen Wirkeintritt sowohl eine hoch potente therapeutische, als auch eine präventive Aktivität an *Plasmodium berghei*-infizierten Mäusen detektiert werden. Eine einmalige Dosis soll ausreichen um die Parasiten abzutöten.¹³⁹ Auch scheint **26** eine Wirkung auf Artemisinin-resistente Stämme zu besitzen.¹⁴⁰ Hervorgegangen ist Artefenomel aus Arterolan (**25**).¹³⁹ Die Adamantan-Peroxid-Teilstruktur scheint für die antiparasitäre Aktivität essenziell zu sein.¹⁴¹ Durch den Ersatz der Amid-Struktur gegen einen Phenyl-Ether-Linker sowie der Einführung des Morpholin-Substituenten konnte die Halbwertszeit von 2–4 h¹⁴² auf 46–62 h¹⁴⁰ gesteigert werden. Ferroquin stellt ein 4-Aminochinolin dar und soll, vergleichbar zu den bekannten Vertretern dieser Substanz-Klasse, die Häm-Detoxifizierung hemmen.¹⁴³ BIOT *et al.* konnten zeigen, dass das umgebende 4-Aminochinolin sowie der Alkylamin-Rest am Ferrocen für die antiparasitäre Aktivität essenziell sind.¹⁴⁴ Es wurde eine Wirkung auf Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Stämme nachgewiesen.^{143,145,146}

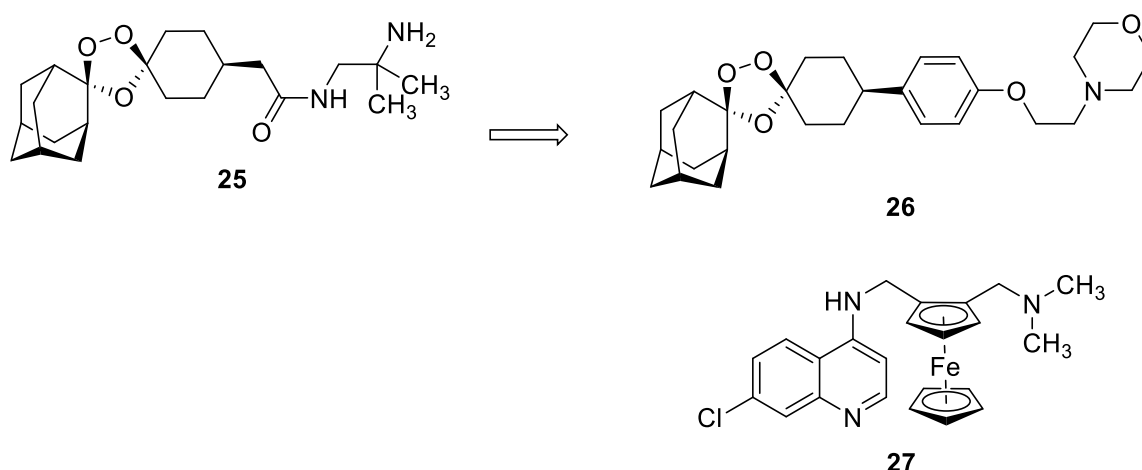


Abbildung 1-9: Neue Wirkstoffe gegen Malaria: Das Trioxolan Artefenomel (**26**), welches aus Arterolan **25** hervorgegangen ist und Ferroquin (**27**).

Ganaplacide (**29**) zeichnet sich durch einen Imidazopiperazin-Grundkörper aus und befindet sich zurzeit in Kombination mit Lumefantrin (**3**) in der klinischen Studienphase IIb (Abbildung 1-10). Entwickelt wurde Ganaplacide auf Grundlage von **28**.

Das Benzodioxol sowie die Phenylringe wurden durch substituierte Phenylreste ersetzt, um einerseits die metabolische Stabilität zu erhöhen und andererseits die Wirkstärke zu verbessern.¹⁴⁷ Außerdem konnte durch Einführung einer Dimethylgruppe am Imidazopiperazin die Potenz weiter optimiert werden.¹⁴⁸ Neben der schizontozidalen Aktivität konnte auch eine Transmissionsblockade im *P. berghei*-Modell durch Ganaplacide festgestellt werden.¹⁴⁹

Trotz des bislang unbekannten Wirkmechanismus wurden bereits Mutationen auf den zu Resistenzen gegen Imidazopiperazine führenden Genen beschrieben, die den *PfCARL* (*P.f. cyclic amine resistance locus*)¹⁵⁰, den *PfACT* (*P.falciparum* Acetyl-CoA-Transporter) sowie den *PfUGT* (*P. falciparum* UDP-Galaktose-Transporter)¹⁵¹ kodieren, welche den Einsatz von **29** gefährden können.

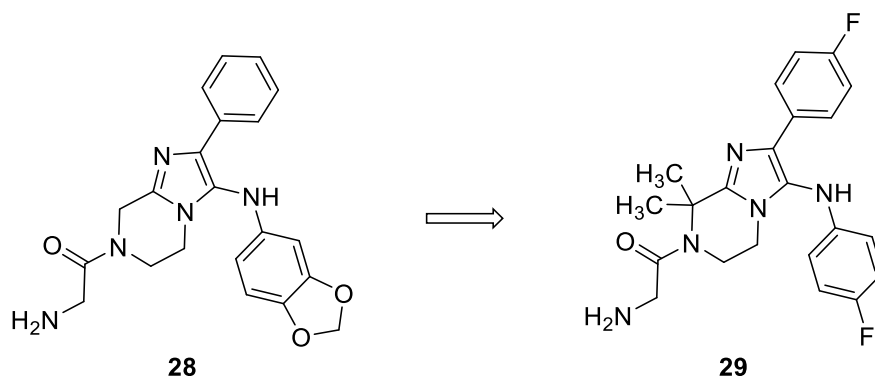


Abbildung 1-10: Der neue Wirkstoff Ganaplacide (**29**) befindet sich in der Kombination mit Lumefantrin (**3**) zurzeit in der klinischen Studienphase IIb.

Seit Februar 2018 befindet sich auch Cipargamin (**31**, Abbildung 1-11) in der klinischen Studienphase II (Abbildung 1-11). Es stellt ein synthetisches Spiroindolon-Derivat dar, welches ein potenzieller Inhibitor der *PfATP4* (*P. falciparum* ATPase 4) ist.¹⁵² Die *PfATP4* ist ein P-Typ ATPase-Transporter, welcher durch den Efflux von Natrium-Ionen eine geringe intrazelluläre Na⁺-Konzentration und somit das Überleben des Parasiten gewährleistet.¹⁵³ Cipargamin wurde von der Struktur des Racemats **30** abgeleitet. Durch Reduzierung des anellierten Azepans zum Piperidin und mit Hilfe einer stereoselektiven Synthese wurde das 1*R*, 3*S*-Enantiomer erhalten, welches eine stärkere Wirkung aufweist.¹⁵⁴ Auch die niedrige Toxizität und lange biologische Halbwertszeit von 20.8 h lassen auf einen geeigneten Wirkstoffkandidat hoffen.¹⁵⁵

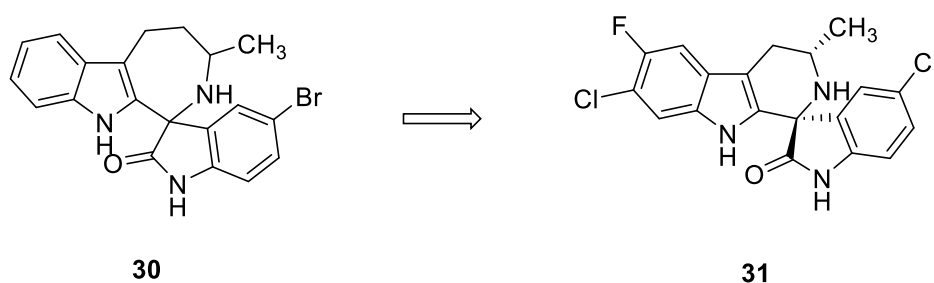


Abbildung 1-11: Cipargamin (**31**) als potenzieller *PfATP4*-Inhibitor in der Malaria-Therapie.

DSM265 (**33**) wurde auf Grundlage eines Target-basierten Hochdurchsatz-Screenings an der *P. falciparum* Dihydroorotat-Dehydrogenase (*PfDHODH*) entdeckt (Abbildung 1-12).¹⁵⁶ *PfDHODH* katalysiert die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat in der *De-novo* Pyrimidin-Biosynthese.¹⁵⁷ In dem Screening wurde **32** als Hit-Struktur identifiziert.¹⁵⁶ Aufgrund der schnellen Metabolisierung sowie unzureichender *in vivo*-Aktivität wurde **32** weiter optimiert. Durch Substitution des Naphthylrings gegen einen Aromaten mit Pentafluorsulfonylgruppe konnte die metabolische Stabilität erhöht werden. Außerdem konnte durch Einführung einer Difluorethylgruppe die Wirksamkeit gesteigert werden.^{158,159} **33** ist sowohl gegen die Blut- als auch die Leberstadien von *P. falciparum* wirksam, allerdings nicht gegen Hypnozoiten.¹⁶⁰ Die klinische IIa Studie aus dem August 2018 zeigt eine schnelle Verminderung der *P. falciparum*-Last unter der DSM265-Therapie. Auch bestätigt die Studie die geringe Effizienz gegen *P. vivax*. Aufgrund der langen Halbwertszeit von 90–115 h ist es den Autoren zufolge jedoch gut geeignet um wiederauftretende *P. falciparum*-Infektionen mit einer Einmaldosis abzuwenden.¹⁶¹

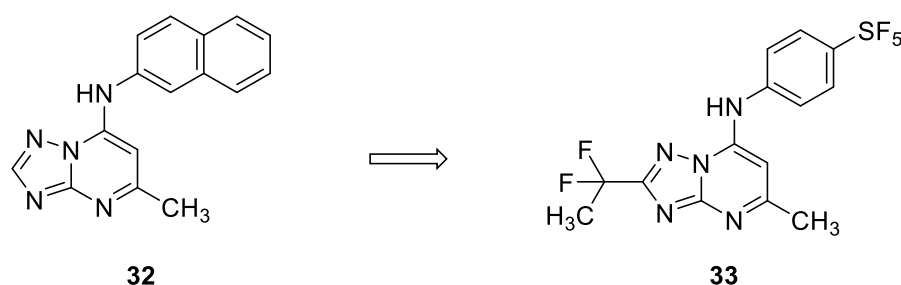


Abbildung 1-12: Der Dihydroorotat-Dehydrogenase-Inhibitor DSM265 (**33**) inhibiert die *De-novo*-Pyrimidin-Biosynthese des Parasiten.

Ebenfalls mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Screenings wurde **34** (Abbildung 1-13) identifiziert, welches zwar eine hohe antiparasitäre *in vitro*-Aktivität aufwies, sich jedoch aufgrund einer schlechten Löslichkeit und geringen metabolischen Stabilität als ungeeignet darstellte. **34** wurde in mehrstufigen Optimierungsprozessen zu MMV048 (**35**) weiterentwickelt.

Die metabolisch labile 3-Methoxy-4-hydroxyphenyl-Gruppe wurde durch einen Trifluormethylpyridyl-Rest ersetzt. **35** zeigt nach einer Einmaldosis von 30 mg/kg eine fast vollständige Reduktion der Parasiten in mit *P. berghei*-infizierten Mäusen.¹⁶² Durch genomische und chemoproteomische Studien wurde für **35** eine inhibitorische Aktivität an der *PfPI4K* (*P. falciparum* Phosphatidylinositol-4-Kinase) nachgewiesen.¹⁶³ Die *PfPI4K* ist eine Lipidkinase, die für Vorgänge des Membrantransports als essenziell nachgewiesen wurde.¹⁶⁴

35 zeigt sowohl eine Wirkung gegen die sexuellen als auch gegen die asexuellen Stadien der Plasmodien, was einen Einsatz sowohl in der Prävention als auch der Behandlung der Malaria ermöglicht.¹⁶³ Zurzeit befindet sich **35** in einer in Äthiopien durchgeführten klinischen Phase IIa-Studie.

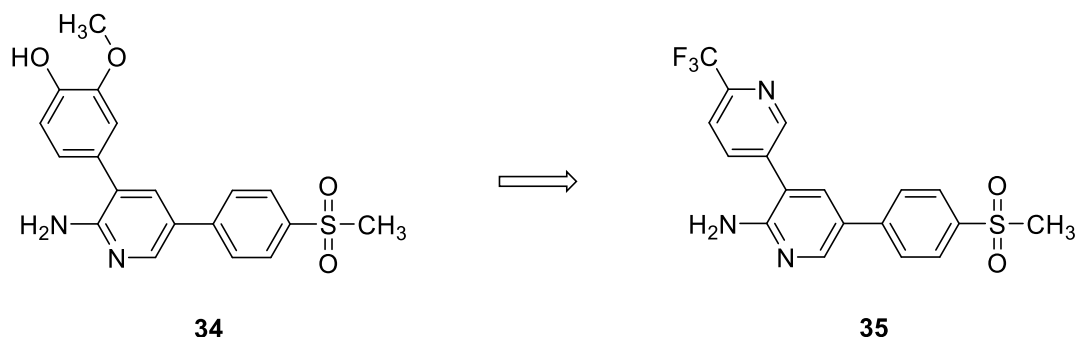


Abbildung 1-13: MMV048 (**35**) als potenzieller *Pf*PI4K-Inhibitor.

1.7 Proteinkinasen als neue potenzielle Targets

Neue Targets und somit neuartige Wirkmechanismen sind aufgrund der beträchtlichen Anzahl an gebildeten Resistenzen gegen antiplasmodiale Arzneistoffe von essenzieller Bedeutung. Proteinkinasen bilden potenzielle Targets für neuartige Mechanismen. SOLYAKOV *et al.* konnten durch phosphoproteomische Analysen und reverse Genetik-Experimente 36 wahrscheinlich essenzielle Kinasen für den asexuellen erythrozytären Zyklus identifizieren.¹⁶⁵ Diese Kinasen werden als „wahrscheinlich essenziell“ bezeichnet, da das Gegenteil bei der durchgeführten Methode nicht ausgeschlossen werden kann. So konnte ALDER zeigen, dass ein *Pf*GSK-3-*knock out* durchaus möglich ist, die Parasiten anschließend jedoch ein verringertes Wachstum aufwiesen.¹⁶⁶ Vereinfacht werden diese Kinasen in der vorgelegten Arbeit als essenziell bezeichnet.

Proteinkinasen stellen eine Superfamilie homologer Proteine dar, die durch Übertragung des γ -Phosphats von ATP oder GTP¹⁶⁷ auf die Hydroxylgruppe einer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Aminosäure des Substratpeptids an einer Vielzahl an Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind. Dazu zählen u.a. metabolische Prozesse, die Transkription, die Proliferation und die Apoptose. Anhand ihrer Substratspezifität werden Proteinkinasen in Serin-/Threoninkinasen oder Tyrosinkinasen unterteilt. In Folge der Phosphorylierung kommt es entweder zur Aktivierung oder Inaktivierung des Folgeenzym, wodurch die entsprechenden Signalwege beeinflusst werden.¹⁶⁸

Proteinkinasen bestehen aus einer kleinen Amino-(N)-terminalen und einer großen Carboxy-(C)-terminalen Domäne, die über eine Polypeptidkette, die sog. *hinge region*, miteinander verknüpft sind.¹⁶⁹ Der Bereich zwischen der N- und der C-terminalen Domäne bildet die ATP-Bindetasche.¹⁶⁷

Im vorderen Bereich dieser Tasche fixiert die *hinge region* über Wasserstoffbrückenbindungen den Adeninring des ATPs. Die hintere *back pocket* besitzt Kinase-regulatorische Funktionen. N-terminal zur *hinge region* befindet sich der *gatekeeper* (*gk*). Diese Aminosäure reguliert den Zugang und die Größe der *back pocket*.¹⁷⁰ Die N-terminale Domäne besteht aus fünf überwiegend antiparallelen β -Faltblättern (β 1- β 5) und einer α -Helix (α C-Helix). Diese Domäne ist wichtig für die Verankerung und Orientierung des Nukleotids.

Zwischen β 1 und β 2 liegt die hoch konservierte Glycin-reiche Schleife (*G-loop*). Diese Schleife umfasst das GxGx Φ G-Motiv und stellt die flexibelste Stelle der N-Domäne dar.¹⁷¹ Φ ist dabei ein hydrophober Rest¹⁶⁸, meist in Form eines Tyrosins oder Phenylalanins¹⁷². Über ionische Wechselwirkungen stabilisiert die G-Schleife die nicht übertragenden α - und β -Phosphatgruppen¹⁷⁰ und richtet so das γ -Phosphat für die Katalyse aus¹⁷¹. Die Konformation der Glycin-reichen Schleife ist dabei dynamisch und abhängig von der Aktivität der katalytischen Domäne. Die α C-Helix ist im aktiven Zustand in Richtung der ATP-Bindetasche orientiert und ermöglicht so die Bildung einer wichtigen Salzbrücke.¹⁷⁰

Die C-terminale Domäne besteht überwiegend aus α -helikalen Strukturen und ist für die Bindung des Peptid-Substrats sowie der Übertragung der Phosphatgruppe verantwortlich. Daneben gibt es vier β -Stränge, die sich in ihrer Funktion unterscheiden: Auf β 6+7 befindet sich die katalytische Schleife, welche das konservierte Y/HRD-Motiv enthält (Tyrosin (Y)/Histidin (H)- Arginin (R)- Asparaginsäure (D)). β 8+9 umrahmen das DFG-Motiv (Aspartat (D), Phenylalanin (F), Glycin (G)).¹⁷¹

Die C-terminale Domäne beinhaltet die Aktivierungsschleife (*A-loop*), welche mit dem DFG-Motiv beginnt und mit dem APE-Motiv (Alanin (A), Prolin (P), Glutaminsäure (E)) endet. Konformationelle Änderungen in der Aktivierungsschleife durch Phosphorylierungsprozesse führen dazu, dass die Kinase einen aktiven oder inaktiven Zustand erlangt.¹⁷¹ Dabei bildet das Lysin des AxK-Motivs (Alanin (A), x, Lysin (K)) des β 3-Strangs eine Salzbrücke zur Glutaminsäure der α C-Helix („Lys-Glu-Salzbrücke“). Hierdurch interagiert das Lysin zusätzlich mit dem α - und β -Phosphat und sorgt für eine korrekte Orientierung des ATPs, welche durch die Glutaminsäure stabilisiert wird.¹⁶⁷ Die Salzbrücke ist für die Aktivität der Proteinkinasen wichtig.¹⁶⁸

Im aktiven Zustand ragt die Aspartat-Seitenkette des DFG-Motivs (*DFG-in*) in die ATP-Bindetasche¹⁷³ und bindet das für die Phosphoryl-Übertragung essenzielle bivalente Kation¹⁷⁰, welches üblicherweise Mg^{2+} oder Mn^{2+} darstellt.¹⁶⁷ Dieses sorgt durch eine korrekte Orientierung des γ -Phosphats für dessen Transfer.¹⁷⁰ Die Phenylalanin-Seitenkette des DFG-Motivs steht in Kontakt mit der α C-Helix und erleichtert so die Bildung der Lys-Glu-Salzbrücke.^{171,172} Des Weiteren wird über das Phenylalanin ein Kontakt zum Y/HRD-Motiv der katalytischen Schleife vermittelt.¹⁷¹ In der inaktiven Konformation ist die Aktivierungsschleife in Richtung der Bindetasche ausgerichtet.¹⁷³

Der aromatische Phenylalaninring des DFG-Motivs blockiert den Zugang zum aktiven Zentrum (DFG-out).¹⁶⁸ Die α C-Helix ist von der ATP-Bindeseite abgewandt, wodurch die Bildung der Lys-Glu-Salzbrücke verhindert wird.¹⁷⁰

Das Y/HRD-Motiv der katalytischen Schleife erleichtert den Phosphat-Transfer. Dabei ist die Asparaginsäure (D) für die richtige Ausrichtung der Hydroxylgruppe des Substrats verantwortlich.¹⁷¹ Tyrosin (Y) oder Histidin bindet an die Carbonylgruppe der Asparaginsäure bzw. stellt einen hydrophoben Kontakt zum Phenylalanin des DFG-Motivs her.¹⁷¹

Das HRD-Motiv wird durch das LKXXN-Motiv erweitert.¹⁶⁷ Das Lysin (K) dient der Erleichterung des Phosphattransfers indem es die negative Ladung des γ -Phosphats neutralisiert.¹⁶⁷ Das Asparagin (N) stabilisiert mittels Wasserstoffbrückenbindungen zum Carbonyl der Asparaginsäure (D) die katalytische Schleife und chelatisiert das bivalente Kation, wodurch das α - und γ -Phosphat überbrückt werden.¹⁶⁷ In der HsGSK-3 ist das Leucin (L) durch ein Isoleucin (I) ersetzt, wohingegen die PfGSK-3 hier das Leucin207 aufweist.

Zur Übersicht der strukturellen Besonderheiten der Proteinkinasen wird hier die Kokristallstruktur der humanen GSK-3 (PDB: 3ZDI¹⁷⁴) mit dem Liganden 3,6-Diamino-4-(2-chlorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2,5-dicarbonitril (**36**) visualisiert (Abbildung 1-14).

A

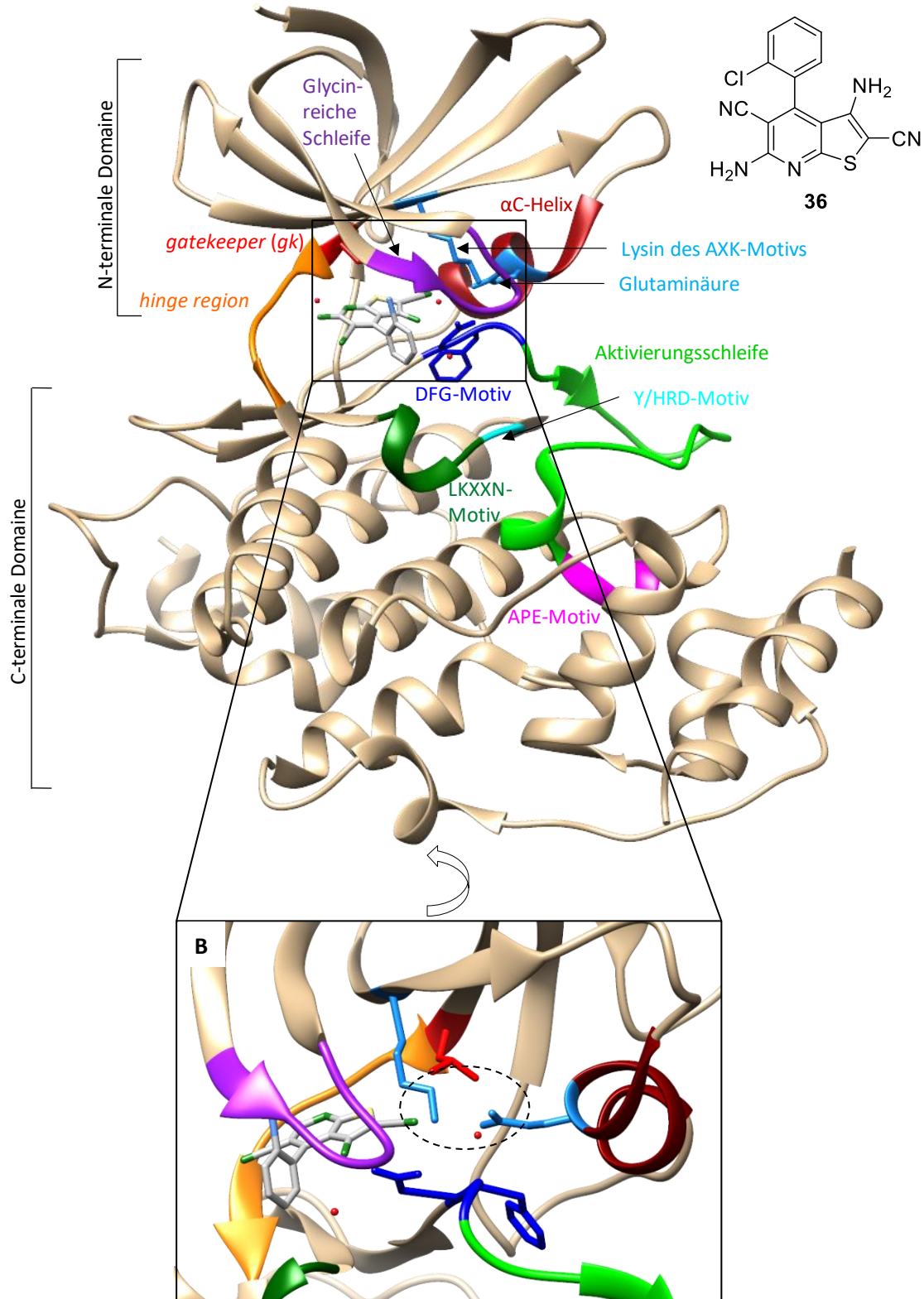


Abbildung 1-14: **A:** Kokristallstruktur der humanen GSK-3 (PDB: 3ZDI¹⁷⁴) mit dem Liganden **36** in beige bzw. hellgrau visualisiert. Die konservierten Aminosäuren der Proteinkinasen sind farbig markiert. *Gatekeeper*: Hellrot; *hinge region*: Orange; DFG-Motiv: Dunkelblau; Lys85 und Glu97: Hellblau; A-loop: Hellgrün; APE-Motiv: Pink; Glycin-reiche Schleife: Violett; αC-Helix: Dunkelrot; Y/HRD-Motiv der katalytischen Schleife: Cyan; LKXXN-Motiv: Dunkelgrün. **B:** Ausbildung der Salzbrücke zwischen Lys-Glu (schwarzer unterbrochener Kreis).

1.7.1 Plasmodiales Kinom

Im Gegensatz zum humanen Kinom ist das plasmodiale Kinom wesentlich kleiner.^{175,176} Es wurden insgesamt 99 kodierende Gene für Proteinkinasen durch genomische Analysen identifiziert.¹⁷⁶ 65 plasmodiale eukaryotische Proteinkinasen wurden 2004 identifiziert, wovon etwa die Hälfte essenziell für die asexuelle erythrozytäre Schizogonie sind.^{165,177} Außerdem wurden 12 Proteinkinasen für die Transmission von *P. berghei* auf den Moskito *in vivo* als essenziell eingestuft.¹⁷⁸

Obwohl viele dieser Kinasen entsprechenden Proteinkinasegruppen im humanen Kinom zugeordnet werden können, sind sowohl die Sequenzhomologie als auch die Kenntnisse über die biologischen Funktionen der entsprechenden plasmodialen Proteinkinasen begrenzt.¹⁶⁵ So wurde z.B. eine homologe *mitogen-activated protein*-Kinase (MAPK) im plasmodialen Kinom entdeckt, ein 3-stufiger MAPK-Weg existiert jedoch nicht.¹⁷⁹ Außerdem besitzt das plasmodiale Kinom weder Tyrosin-Kinasen (TyrK) noch Kinasen der *sterile*-Gruppe (STE-Gruppe).¹⁷⁷ Stattdessen enthält der Parasit Calcium-abhängige Kinasen (*calcium-dependent protein kinases*, CDPKs) und *orphan*-Kinasen, die nicht im humanen Kinom aufzufinden sind.^{177,180} Hoch selektive Inhibitoren sind besonders gegen diese Kinasen denkbar.

Die plasmodialen eukaryotischen Proteinkinasen können in folgende Gruppen gegliedert werden:

1. Die AGC-Gruppe ist nach den Proteinkinasen PKA, PKG und PKC benannt. Es konnte bewiesen werden, dass die PfPKA, PfPKB und die PfPKG essenziell für den erythrozytären asexuellen Lebenszyklus von *P. falciparum* sind.¹⁶⁵ In Folge der Bindung von cAMP wird die PfPKA aktiviert, wodurch eine Vielzahl an Mechanismen gesteuert werden.¹⁸¹ Hierdurch kann z. B. die für die Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten notwendige Phosphorylierung des *apical-membran-antigen 1* (AMA1) durch die PfPKA erfolgen.¹⁸² Durch Phosphorylierung der PfCDPK1, von Myosin A oder GAP45 (Glideosom-assoziiertes Protein) ist die PfPKA außerdem für die Motilität der Parasiten wichtig.¹⁸³ Zusätzlich konnte ein regulatorischer Einfluss auf die Micronemen-Sekretion nachgewiesen werden.¹⁸⁴ Micronemen sind sekretorische Organellen, die Proteine wie das PfAMA1 absondern, welche zur Erythrozyten-Invasion nötig sind.¹⁸⁵ Auch die PfPKB scheint durch Phosphorylierung von GAP45 essenziell für die Motilität und erythrozytäre Invasion zu sein.¹⁸⁶ Die cGMP-abhängige PfPKG phosphoryliert über 60 Proteine und nimmt hierdurch Einfluss auf zelluläre Aktivitäten, wie Proteolyse, Proteintransport und Genregulation. Über die Phosphorylierung der PfCDPK1 ist sie zusätzlich für die Parasiteninvasion in die Erythrozyten essenziell.¹⁸⁷ Auch wurde eine Beteiligung am Transfer von PfSUB1 (*P. falciparum subtilisin-like serin protease*) nachgewiesen. Diese Serinprotease ist für die Entwicklung der Merozoiten wichtig.¹⁸⁸

Des Weiteren wurde der Einfluss der *PfPKG* auf die ookinetische Motilität nachgewiesen. Hierbei scheint die Calcium-regulierende Funktion der *PfPKG* von essenzieller Bedeutung zu sein.¹⁸⁹ Darüberhinaus ist die *PfPKG* für die Sporozoiten-Invasion in die Hepatozyten wichtig.¹⁹⁰

2. Die Aurora-verwandten Kinasen sind Serin-/Threoninkinasen. Im plasmodialen Kinom konnten die Aurora-verwandten Kinasen *PfArk-1*, *PfArk-2* und *PfArk-3* nachgewiesen werden, die essenziell für die asexuelle Schizogonie sind.¹⁶⁵ Immunofluoreszenz-Versuche deuten auf eine vorübergehende Verknüpfung der *PfArk-1* mit dem Spindelpolkkörper, dem plasmodialen Äquivalent des Zentrosoms, in der M-Phase der Zellteilung hin.¹⁹¹

3. Die Calcium-abhängigen Kinasen (CDPK) übernehmen unterschiedliche Funktionen im Lebenszyklus des Parasiten.¹⁹² Die *PfCDPK1* phosphoryliert die regulatorische Untereinheit der *PfPKA*, wodurch die Erythrozyteninvasion beeinflusst werden kann.¹⁹³ Diesbezüglich scheint die *PfCDPK1* auch eine regulatorische Rolle in der für die Erythrozyteninvasion notwendigen Micronemen-Sekretion¹⁹⁴ sowie in der Gametogenese¹⁹⁵ zu übernehmen. Die *PfCDPK2* ist für die Entwicklung des Microgameten in den männlichen Gameten essenziell und stellt somit einen möglichen Transmissionshemmer dar.¹⁹⁶ Die *PfCDPK3* scheint für die ookinetische Beweglichkeit und somit für die Invasion ins Mitteldarmepithel der Mücke essenziell zu sein.¹⁹⁷ Die *PfCDPK4* ist u.a. für die Gametenbildung¹⁹⁸ sowie für die Invasion der Sporozoiten in die Leberzellen¹⁹⁰ notwendig. Die *PfCDPK5* in Verbindung mit *PfPKG* scheint daneben in die Translokation von *PfAMA1* und die Entladung der Micronemen involviert zu sein.¹⁹⁹ Auch die *PfCDPK6* ist neben der *PfCDPK4* für die Hepatozyteninvasion wichtig.²⁰⁰ Für die *PfCDPK7* konnte gezeigt werden, dass sie für die Entwicklung der Parasiten des Blutstadiums und somit für die parasitäre Proliferation essenziell ist.²⁰¹

4. Die Casein-Kinase 1 (*PfCK1*), welche zu der CK-Gruppe gehört, ist essenziell im erythrozytären asexuellen Stadium¹⁶⁵ und wird während der Trophozoitenentwicklung auf die Erythrozytenmembran sekretiert.²⁰² Interaktom-Experimente und Kinase-Assays lassen auf die Mitwirkung der *PfCK1* an zahlreichen zellulären Prozessen wie dem RNA-Splicing, dem Transport von Proteinen und der Erythrozyten-Invasion schließen.²⁰³

5. NimA (*never-in-mitosis, gene A*)/NEK (*NIMA related kinase*)-verwandte Kinasen stellen teilweise essenzielle Serin-/Threonin-Kinasen dar.¹⁶⁵ Die *PfNEK1* ist für den asexuellen Zellzyklus im Blutstadium des Parasiten essenziell.^{165,204} *PfNEK2-4* werden dagegen hauptsächlich in Gametozyten exprimiert. Für *PfNEK2* sowie *PfNEK4* wurde eine bedeutende Rolle in der Gametogenese nachgewiesen.^{205,206}

6. Innerhalb der *Tyrosine-Kinase-like*-Familie (TKL) konnten die *PfTKL1* und die *PfTKL3* als essenziell für den erythrozytären Lebenszyklus des Parasiten nachgewiesen werden.¹⁶⁵ Die *PfTKL3* wird sowohl im asexuellen als auch im Gametozyten-Stadium exprimiert.²⁰⁷

7. Die Gruppe der *orphan*-Kinasen beinhaltet strukturell nicht anderweitig zuordnungsfähige Kinasen. DORIN-SEMBLAT *et al.* konnten mit Hilfe von reversen Genetik-Experimenten zeigen, dass es bei *PfPK7*(-)-Klonen sowohl zu einer Reduktion der asexuellen Proliferation als auch zu einer reduzierten Oozystenbildung kommt.²⁰⁸ Die *PfPK9* wurde als essenziell identifiziert.¹⁶⁵ Die *PfPK9* phosphoryliert das *PfUBC13* (*Ubiquitin-conjugating enzyme*), wodurch dessen Ubiquitin-konjugierende Funktion einschränkt wird. Hierdurch kann eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflusst werden.²⁰⁹ Die FIKK-Familie, welche nach der Aminosäuresequenz Phenylalanin (F), Isoleucin (I), Lysin (K) und Lysin (K) in der N-terminalen Region der Kinasedomäne benannt ist, wurde als nicht essenziell für das asexuelle Parasitenstadium identifiziert.¹⁶⁵ Allerdings wurde für die FIKK4.2 ein Einfluss auf die Rigidität und Adhäsionsfähigkeit der infizierten Erythrozyten beobachtet.²¹⁰ Auch die FIKK7.1 und die FIKK12 scheinen die Starrheit der Erythrozytenmembran zu modulieren.²¹¹ Die Flexibilität und Adhäsivität der Erythrozytenmembran ist für den Krankheitsverlauf bei der Malaria tropica von Bedeutung (Unterkapitel 1.2).

8. Die CMGC-Gruppe ist nach den vier Familien CDK (*cyclin-dependent kinases*), MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), GSK (*glycogen synthase kinases*) und CLK (*cdc-like kinases*) benannt. Die essenzielle *PfMRK* (*P. falciparum MO-15 related kinase*)¹⁶⁵, eine Kinase der CDK-Familie, scheint eine Rolle in der DNA-Replikation zu besitzen.²¹² Die ebenfalls essenzielle *PfCRK3* (*P. falciparum cdk-related kinase 3*)¹⁶⁵ ist für die intraerythrozytäre Entwicklung des Parasiten von Bedeutung. Dabei wird über den Eingriff in die Genexpression durch Chromatin-Variationen spekuliert.²¹³ Ebenso wird als Regulator der Zellteilung die Cyclin-abhängige, essenzielle *PfPK5*¹⁶⁵, welche eine hohe Ähnlichkeit zur humanen *HsCDK2* aufweist, vermutet.^{214,215} Im Gegensatz zur *PfMAP1* (*P. falciparum mitogen-activated protein*) ist die *PfMAP2* essenziell.¹⁶⁵ Die *PfMAP2* wird im Zellkern von sämtlichen asexuellen Parasitenstadien wiedergefunden.²¹⁶ Durch reverse Genetik-Experimente konnte gezeigt werden, dass die *PfMAP2* notwendig für den asexuellen Lebenszyklus des Parasiten ist. Aufgrund erhöhter *PfMAP2*-Expression bei fehlender *PfMAP1*-Exprimierung ist allerdings ein kompensatorischer Einfluss der *PfMAP1* denkbar.²¹⁷ Darüber hinaus konnte für die *PfMAP2* eine Funktion in der Differenzierung männlicher sexueller Parasitenstadien in *P. berghei* detektiert werden.²¹⁸ Die dual-spezifischen *PfCLK1-4* nehmen durch Phosphorylierung von Serin-/Arginin-reichen (SR) Proteinen Einfluss auf die Verarbeitung der Prä-mRNA. Durch Inhibition der *PfCLKs* konnte eine essenzielle Rolle sowohl während der Schizogonie als auch der Gametozytenentwicklung belegt werden.²¹⁹ Auch die essenzielle *PfGSK-3*¹⁶⁵ kann der CMGC-Familie zugeordnet werden. Aufgrund der Bedeutung dieser Proteinkinase für die vorliegende Arbeit wird sie im folgenden Kapitel genauer betrachtet (Kapitel 1.7.1.1).

1.7.1.1 Die *PfGSK-3*

DROUCHEAU *et al.* gelang die Klonierung und Expression der 452 Aminosäuren langen *PfGSK-3* des Stamms 3D7. Beim Vergleich der plasmodialen und humanen GSK-3 wurde eine hohe Sequenzübereinstimmung überwiegend zur humanen GSK-3 β -Isoform festgestellt. Dabei wies die zentral-katalytische Domäne eine zu 58.2% identische, sowie eine zu 76.0% ähnliche Sequenzabfolge auf. Insgesamt ist die Proteinsequenz der *PfGSK-3* verglichen mit der *HsGSK-3 β* zu 43.1% identisch und zu 58.9% ähnlich.²²⁰ KRUGGEL und LEMCKE berichten von ähnlichen Übereinstimmungen.²²¹ Abweichungen finden sich vor allem außerhalb der katalytischen Domänen wieder. Die N-terminale Domäne weist eine außergewöhnliche Verlängerung der Sequenz um 23 Aminosäuren auf. Die Aminosäuren Lys85, Glu97, Asp181 und Asp200 des aktiven Zentrums der *HsGSK-3* finden sich identisch in der *PfGSK-3* wieder (Lys108, Glu20, Asp206 und Asp225). Auch der Phosphat-bindende Bereich der *HsGSK-3* entspricht den Aminosäuren der *PfGSK-3* (Arg96, Arg180, Lys205, Val214 resp. Arg119, Arg205, Lys230, Val239). Weiterhin weist die Aktivierungsdomäne der *HsGSK-3* (Arg220, Arg223, Tyr216) vergleichbare Aminosäuren wie die *PfGSK-3* (Arg245, Arg248, Tyr241) auf. Die Phosphorylierung von Tyr216 bzw. Tyr241 bewirkt eine verstärkte Aktivität der Kinasen.^{220,222} Das Ser9 der *HsGSK-3*, welches nach Phosphorylierung zur Inaktivierung der Kinase führt, ist in der *PfGSK-3* allerdings nicht vorhanden.^{220,223,224} Unterschiede in dem ATP-bindenden Bereich sind begrenzt. Von den 35 Aminosäuren der ATP-Bindetasche unterscheiden sich sechs, sodass dieser Bereich der *HsGSK-3 β* verglichen zur *PfGSK-3* zu 82.9% identisch ist. KRUGGEL gibt für die Bereiche der ATP-Bindetaschen beider Kinasen eine detaillierte Übersicht der unterschiedlichen Aminosäuren und erläutert abweichende Eigenschaften.²²⁵ Die *back pocket* der *HsGSK-3* wird durch das Leu132 (*gk*) versperrt, wohingegen die *PfGSK-3* dort ein Met132 aufweist. Über polare Wechselwirkungen zum Methionin-Schwefel sind selektive Inhibitoren der *PfGSK-3* gegenüber der *HsGSK-3* denkbar. Methionin ist wesentlich flexibler, jedoch auch größer als Leucin.²²⁶ Darüber hinaus ist die Ausbildung der Lys-Glu-Salzbrücke zur korrekten Orientierung des ATPs nicht möglich, da die *PfGSK-3* anstelle der Glutaminsäure hier ein Glutamin aufweist (Lys141 und Gln137). Eine Interaktion von Lys141 mit dem *backbone*-Carbonyl von Ile62 ist allerdings denkbar, die zu sterischen Hinderungen am Eingang der Bindetasche führen kann.²²⁶ Ebenso wurde eine enge Verwandtschaft der *PfGSK-3* mit der jeweiligen GSK-3 weiterer unizellulärer Parasiten und Hefen nachgewiesen.^{220,226}

Für die rekombinante *PfGSK-3* wurde gezeigt, dass neben der Glykogen-Synthase auch das Substratpeptid GS-1 und das mikrotubuläre Bindungsprotein *tau* phosphoryliert wird. Die *PfGSK-3*-mRNA wurden dabei in den Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadien des Parasiten detektiert. Dagegen wurde das *PfGSK-3*-Protein hauptsächlich während des frühen Trophozoitenstadiums nachgewiesen.²²⁰

Durch Immunofluoreszenz-Studien konnte die *PfGSK-3* im Zytoplasma der Wirtszelle nachgewiesen und mit den *Maurer's clefts* in Verbindung gebracht werden.²²⁰ Diese sind membranöse Strukturen, die bei der Weiterleitung parasitärer Proteine von Bedeutung zu sein scheinen.²²⁷ Eine Beteiligung von *PfGSK-3* an dem Transport parasitärer Proteine ist deshalb denkbar. DROUCHEAU *et al.* mutmaßen, dass die verlängerte N-terminale Domäne mit dem Übergang der *PfGSK-3* in das Zytoplasma des Erythrozyten sowie mit der *PfGSK-3*-assoziierten Lokalisation bei den *Maurer's clefts* in Verbindung steht.²²⁰

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zur *HsGSK-3* wird über ähnliche Funktionen der *PfGSK-3* spekuliert. Hierzu gehören Funktionen im Metabolismus, in der Zelldifferenzierung sowie in der Kontrolle des Zellzyklus.²²⁰

Außerdem wurde gezeigt, dass die homologe GSK-3 der Fruchtfliege im zirkadianen Rhythmus involviert ist.²²⁸ Aufgrund des meist synchronisierten Lebenszyklus der Parasiten ist ein Einfluss der *PfGSK-3* hier denkbar. PRINZ *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass das für die Erythrozyteninvasion essenzielle *PfAMA1* durch die *PfGSK-3* am Thr613 phosphoryliert werden muss.²²⁹

1.7.1.1.1 Forschung an *PfGSK-3*-Inhibitoren

Bis zum jetzigen Zeitpunkt (Stand: Juni 2020) stehen Proteinkinase-Inhibitoren zur Behandlung der Malaria nicht zur Verfügung. In Anbetracht des großen Umfangs an Kinasen, die essenzielle Funktionen in diversen Lebensstadien des Parasiten übernehmen, stellen sie attraktive, bislang ungenutzte Targetstrukturen dar. Auf dieser Grundlage sind neue Wirkmechanismen denkbar, wodurch zusätzlich bereits resistente Erreger erfolgreich adressiert werden können. Eine interessante Zielstruktur stellt dabei die *PfGSK-3* dar. Eine ausreichende Selektivität gegenüber dem humanen Ortholog ist hier eine nicht unerhebliche Herausforderung.

Paullone und Indirubine sind bekannte GSK-3 Inhibitoren. Indirubine hemmen sowohl die humane als auch die parasitäre GSK-3. Paullone weisen eine selektive Affinität gegenüber *HsGSK-3* auf.²²⁰ Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch *PfGSK-3*-selektive Inhibitoren möglich sind. Mittels bioinformatischer Analysen konnten OSOLODKIN *et al.* diese Selektivität begründen.²²⁶

Verschiedene Strukturklassen werden hinsichtlich ihrer Aktivität an der *PfGSK-3* untersucht. Eine Strukturklasse stellen dabei Manzamin-Alkaloide dar, welche marinen Ursprungs sind (Abbildung 1-15). Die Alkaloide wurden erstmals aus dem Meeresschwamm *Haliclona sp.* gewonnen.²³⁰ Manzamin A (**37**) weist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Aktivität gegen den Parasiten auf.^{231,232} An *P. falciparum* des Stamms D6 konnte *in vitro* ein IC₅₀-Wert von 4.5 µM bestimmt werden. Die Inhibition der *HsGSK-3β* durch **37** lässt auf einen ähnlichen Wirkmechanismus im Parasiten schließen. Basierend auf *docking*-Studien mit 8-Hydroxymanzamin A (**38**) ist eine Inhibition der *HsGSK-3β* möglich.

Strukturoptimierungen sind hierbei jedoch noch notwendig, um die Selektivität gegenüber der *Pf*GSK-3 zu erhöhen.²³¹

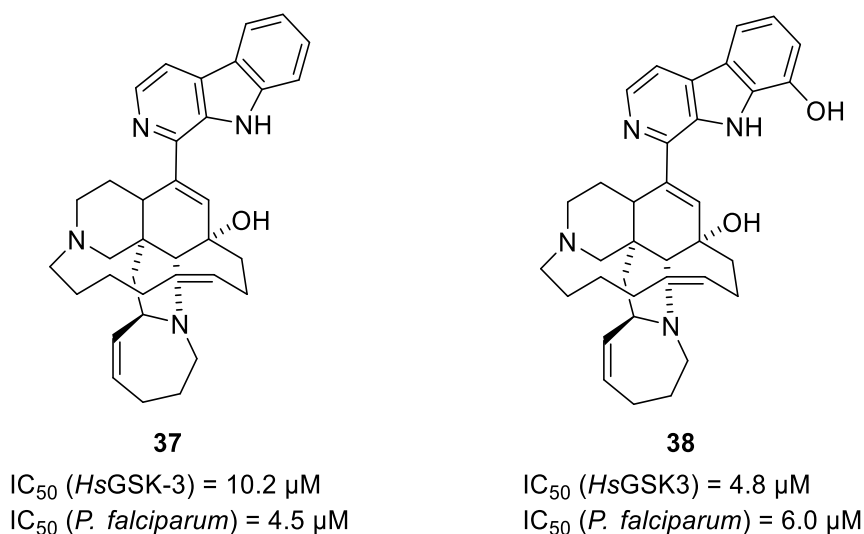
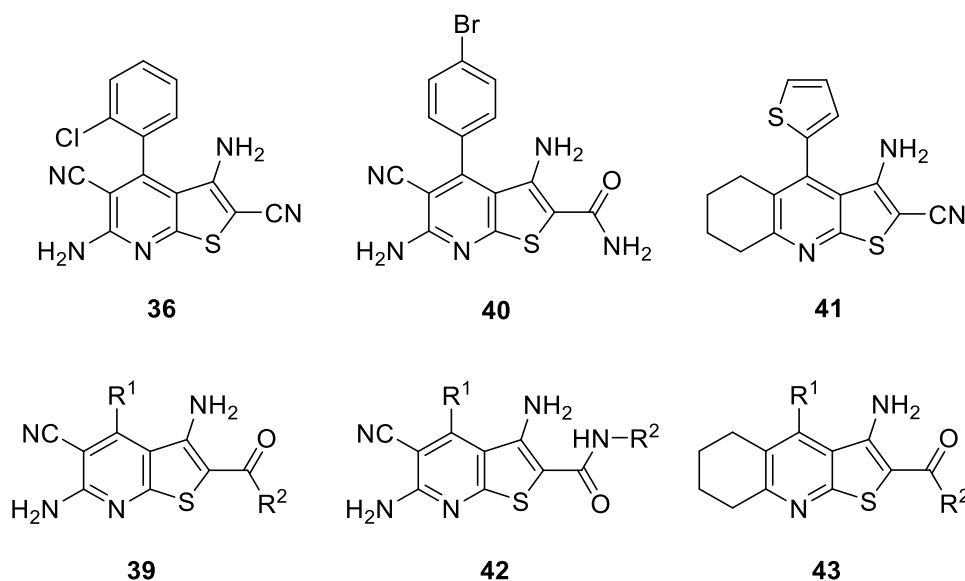


Abbildung 1-15: Manzamin A (**37**) und 8-Hydroxymanzamin A (**38**) als potenzielle GSK-3-Inhibitoren.²³¹

In einem Hochdurchsatzscreening an der *Pf*GSK-3 wurde ein Thienopyridin-Grundgerüst als potenzielle Leitstruktur erhalten. Dabei wurde von 10480 Substanzen in den Laboratorien von MEIJER *et al.* bei 18 Substanzen bei einer Konzentration von 10 μ M eine über 50%ige Inhibition der Kinase detektiert. Diese Verbindungen wurden zusätzlich an der Säugetier-GSK-3 (*Ss*GSK-3, *Sus scrofa* GSK-3) untersucht.¹⁷⁴ Fünf dieser GSK-3-Inhibitoren zeichneten sich durch ein 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-Grundgerüst aus. **40** und **41** stellten sich dabei als potenteste, jedoch nicht besonders selektive Vertreter heraus. Mit Hilfe einer Kokristallstruktur konnte für **36** die Position des Liganden in der *Hs*GSK-3-Bindetasche aufgeklärt werden. Hierdurch wird die inhibitorische Wirkung dieser Verbindung an der *Hs*GSK-3 verdeutlicht. In einem zweiten Screening mit 427 Thieno[2,3-*b*]pyridin-Derivaten wurde mit **39a** ein sowohl hoch aktiver, als auch gegenüber der Säugetier-GSK-3 selektiver *Pf*GSK-3-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 1.61 μ M identifiziert. FUGEL *et al.* konnten anschließend mit **39b** die Aktivität an der *Pf*GSK-3 weiter steigern. Der *ortho*-Chlor-Substituent scheint dabei wichtig für die Selektivität zu sein. Dieser verhindert eine zu der Kokristallstruktur von **36** in der *Hs*GSK-3 vergleichbare Position der Verbindung **39b** in der ATP-Bindetasche des humanen Enzyms. Sowohl größere als auch kleinere Substituenten in dieser Position verringerten die Aktivität am plasmodialen Enzym (vgl. **39c** und **39d**). Zusätzlich konnte bei in dieser Position unsubstituierten Derivaten ein Verlust der inhibitorischen Aktivität festgestellt werden (Verbindung nicht abgebildet). Darüber hinaus scheint der 3-Chlor-Benzoylrest sowohl für die *Pf*GSK-3-Inhibition als auch für die Selektivität von Bedeutung zu sein.

Mit Hilfe eines Kinom-Scans an 402 humanen Kinasen konnten FUGEL *et al.* mögliche Interaktionen mit weiteren humanen Kinasen weitgehend ausschließen. Auch eine inhibitorische Aktivität an GSK-3-Orthologen anderer Mikroorganismen, wie *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* oder *Trypanosoma cruzi*, wurde widerlegt. Die von FUGEL *et al.*¹⁷⁴ aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden in Abschnitt 3 diskutiert. Interessanterweise wurden für die strukturverwandten Thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **42** und Tetrahydrothienochinoline **43** weder eine Hemmung der *Pf*GSK-3 noch der Säugetier-GSK-3 ermittelt (Tabelle 1-2).¹⁷⁴

Tabelle 1-2: Inhibition der *Pf*GSK-3 resp. *Ss*GSK-3 durch ausgewählte Thieno[2,3-*b*]pyridine (Daten aus FUGEL *et al.*¹⁷⁴).

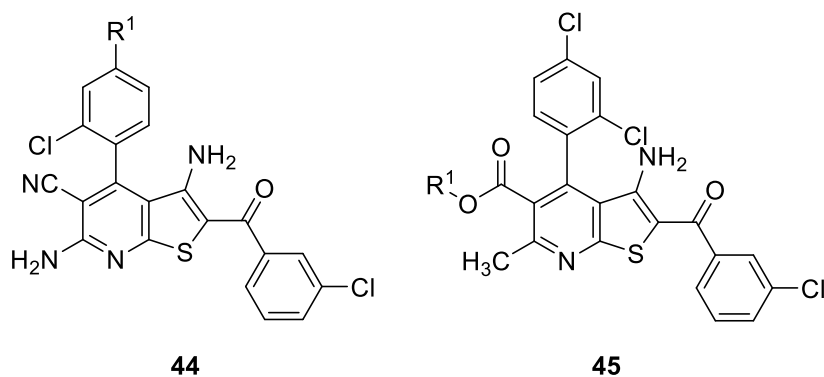


Verbindung	R ¹	R ²	IC ₅₀ (<i>Pf</i> GSK-3) [μM]	IC ₅₀ (<i>Ss</i> GSK-3) [μM]
36	-	-	0.13	0.4
40	-	-	3.0	7.0
41	-	-	9.0	>10
39a	2-IPh	4-ClPh	1.61	>100
39b	2-ClPh	3-ClPh	0.48 0.06*	>10
39c	2-(H ₃ CO)Ph	3-ClPh	8.5	>10
39d	2-FPh	3-ClPh	10	>100
42	2-ClPh	4-ClPh	>10	>10
43	2-IPh	4-ClPh	>10	>10

* Werte aus zwei Testreihen.

In Anschlussarbeiten untersuchte MASCH durch weitere Strukturvariationen den Einfluss der Substituenten auf die Aktivität. In *docking*-Studien wurde dargestellt, dass die 4-Position des 4-Phenylrings zur Lösungsmittel-zugewandten Seite in der ATP-Bindetasche der *Pf*GSK-3 zeigt. Die Inkorporation von 4'-Alkoxy-Substituenten führte im Vergleich zu **39b** zur Verringerung der antiplasmodialen Aktivität (vgl. **44a** und **44b**). Dagegen blieb bei 4'-(*N,N*-Dialkylamino)-Substituenten die Aktivität erhalten. Durch chromatographische Enantiomerentrennung konnte MASCH außerdem die antiplasmodiale Aktivität des Racemats **rac-44c** dem **44c-(+)**-Enantiomer zuordnen, wohingegen **44c-(-)** keine entsprechende Wirkung aufwies. Verbindung **44c-(+)** zeigte darüber hinaus eine besonders geringe Zytotoxizität an einer humanen monozytären Zelllinie. Auch für die basisch substituierten Verbindungen **44d** und **44e** wurde eine gute antiplasmodiale Wirkung ermittelt. Am Beispiel von **45** wurde gezeigt, dass die 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur durch Ester-Strukturen austauschbar ist, ohne dass die Aktivität beeinflusst wird. Die hohe Aktivität von **45** führte MASCH auf die geringe Stabilität der *tert*-Butylgruppe im sauren Milieu zurück. Da die Erreger sich in einer sauren parasitophoren Vakuole innerhalb des Erythrozyten befinden, könnte sich **45** nach Abspaltung der *tert*-Butylgruppe hier anreichern. Allerdings wurde durch das Derivat **45b** mit der freien Säure-Funktion keine vergleichbare antiplasmodiale Wirkung erhalten (Tabelle 1-3).²³³

Tabelle 1-3: Antiplasmodiale Aktivität ausgewählter Verbindungen aus den Arbeiten von MASCH.²³³



Verbindung	R ¹	% Inhibition ± SD ^a , <i>Pf</i> NF54-Luc ^b bei 3 µM	IC ₅₀ [µM], <i>Pf</i> NF54-Luc ^b
44a	H ₃ CO-	33.2 ± 3.2	12.2
44b	2-Hydroxyethoxy-	25.6 ± 3.3	20.0
Rac-44c	Diethylamino-	79.0 ± 0.0	0.6
44c-(+)	Diethylamino-	73.0 ± 1.2	1.1
44c-(-)	Diethylamino-	-24.4 ± 10.4	n. b. ^c
44d	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino-	99.9 ± 0.1	1.2
44e	Piperazino-(als Hydrochlorid)	75.7 ± 1.5	2.3

Tabelle 1-4: Antiplasmodiale Aktivität ausgewählter Verbindungen aus den Arbeiten von MASCH (Fortsetzung).²³³

Verbindung	R ¹	% Inhibition \pm SD ^a , <i>Pf</i> NF54-Luc ^b bei 3 μ M	IC ₅₀ [μ M], <i>Pf</i> NF54-Luc ^b
45a	<i>tert</i> -Butyl-	68.5 \pm 4.4	1.5
45b	H	29.5 \pm 1.7	n. b. ^c

^a Standardabweichung. ^b Lumineszenz-basierter Luciferase-Assay mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten des Stamms NF54. ^c n. b.: nicht bestimmt.

1.8 Bedeutung physikochemischer Eigenschaften in der Wirkstoffentwicklung

Bereits in der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung sollten neben einer sehr guten biologischen Aktivität die auch als ADME (Absorption, Distribution, Metabolisierung, Eliminierung) bezeichneten pharmakokinetischen Eigenschaften beachtet werden. Nach den Ergebnissen einer Studie von PRENTIS *et al.* wurden etwa 40% der potenziellen neuen Wirkstoffkandidaten aufgrund ihrer schlechten Pharmakokinetik nicht weiterentwickelt. Diese Zahl ist den Autoren zufolge deshalb so hoch, weil 30% der untersuchten Therapeutika Antiinfektiva darstellten. Aufgrund relativ geringer Toxizitäten und der schnell durchführbaren *in vitro*-Aktivitätsbestimmungen werden in dieser Indikationsgruppe schnell präklinische Testphasen erreicht. Insbesondere antiinfektive Wirkstoffe wurden jedoch häufig für weiterführende Studien ausgeschlossen, da sie nicht ausreichend absorbiert wurden.²³⁴

Für eine ausreichende Absorption sind eine gute Löslichkeit sowie eine gute Membranpermeabilität des Wirkstoffes von essenzieller Bedeutung.²³⁵ AMIDON *et al.* haben bereits 1995 das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (*biopharmaceutical classification system*, BCS) entwickelt, in dem Wirkstoffe hinsichtlich der Löslichkeit und der Membranpermeabilität unterteilt werden.²³⁶ Mittlerweile werden auf Grundlage dieses Systems sogar behördliche Entscheidungen hinsichtlich Bioäquivalenzstudien in Zulassungsverfahren getroffen.

Die von LIPINSKI *et al.* aufgestellte *Rule of five* (Ro5) beinhaltet wichtige Parameter, die die Löslichkeit und Permeabilität beeinflussen.²³⁷ Durch Auswertung eines zuvor selektierten Datensatzes aus dem *World Drug Index* (WDI) wurden Wirkstoffe hinsichtlich ihrer chemischen Gemeinsamkeiten untersucht. So korreliert ein hoher logP-Wert, der ein Maß für die Lipophilie darstellt, mit einer limitierten Löslichkeit und somit schlechten Absorption. Wirkstoffe mit einer geringen Lipophilie weisen jedoch häufig eine ungenügende Membranpermeabilität auf.²³⁸ Darüber hinaus führt eine erhöhte Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren bzw. -donatoren (HBA/HBD) zu einer gesteigerten Löslichkeit, jedoch gleichzeitig zu einer reduzierten Membranpermeabilität.²³⁹ Die Löslichkeit kann durch aufwendige technologische Formulierungen verbessert werden. Eine Permeabilitätserhöhung wird durch Strukturmodifikationen oder Prodrug-Formulierungen erreicht.²³⁹

Die Herausforderung besteht bei der Arzneistoffentwicklung im Hinblick auf ausreichende Absorption demzufolge in einem ausgewogenen Verhältnis von Permeabilität und Löslichkeit. Entsprechend der Ro5 sollten potenzielle Wirkstoffkandidaten weniger als fünf HBD bzw. weniger als zehn HBA, eine relative Molmasse von weniger als 500 und einen logP-Wert von unter fünf haben. Interessanterweise passen einige bedeutende orale Therapeutikaklassen, wie Antibiotika und Antiprotozoika, nicht in dieses Konzept. Die Autoren postulieren, dass diese Verbindungen häufig Substrate natürlich vorkommender Transporter darstellen und infolgedessen die zelluläre Aufnahme nicht von der Membranpermeabilität begrenzt wird. Die Ro5 findet hier somit keine Anwendung.²³⁷ GOODWIN *et al.* konnten darüber hinaus belegen, dass die Membranpermeabilität besser mit dem $\log P_{\text{Heptan/Ethylenglykol}}$ -Koeffizienten als mit dem $\log P_{\text{Oktanol/Wasser}}$ -Koeffizienten korreliert.²⁴⁰

Durch eine Steigerung der Lipophilie kann neben der Membranpermeabilität auch die Bindungsaffinität positiv beeinflusst werden. Dies führt zu einer verstärkten Wirkstoffmodellierung in Richtung großer lipophiler Moleküle.²⁴¹ Hochkomplexe neue Targetstrukturen erfordern jedoch zum Teil große, lipophile Moleküle, wodurch dieser Trend in der Wirkstoffmodellierung gerechtfertigt werden kann.²⁴¹

Die orale Bioverfügbarkeit ist der Anteil des Wirkstoffs, der nach oraler Applikation unverändert systemisch verfügbar ist.²³⁸ Diese wird neben der Absorption weiterhin durch metabolische Prozesse, wie dem First-Pass-Effekt, beeinflusst.

VEBER *et al.* zeigten, dass unabhängig von der relativen Molmasse die molekulare Flexibilität sowie die polare Oberfläche (*polar surface area*, PSA) oder die Summe aus HBA und HBD eine verlässliche Vorhersage für die orale Bioverfügbarkeit ergibt.²⁴² Die molekulare Flexibilität ergibt sich aus der Anzahl der rotierbaren Einfachbindungen, wobei C-N-Bindungen in Amid-Gruppen aufgrund der hohen Rotationsenergiebarriere und Einfachbindungen in Ringen nicht berücksichtigt werden. So kann bei Verbindungen mit einer PSA von max. 140 Å² oder max. 12 HBA und HBD sowie zusätzlich weniger als zehn rotierbaren Bindungen eine gute orale Bioverfügbarkeit vermutet werden.²⁴² Die polare Oberfläche (PSA) ist definiert als die Summe der Oberflächen aller polaren Atome, welche hauptsächlich Stickstoff und Sauerstoff darstellen.²⁴¹ Die alternativen Bedingungen (PSA oder die Summe aus HBA und HBD) resultieren daraus, dass der größte Beitrag zur PSA durch die Summe aus HBA und HBD erzielt wird und somit diese beiden Werte gut korrelieren. Den Autoren zufolge korreliert die PSA und die Summe aus HBA und HBD weniger gut mit dem von LIPINSKI *et al.* genutzten clogP-Wert²³⁷, da der clogP-Wert nicht das Vorkommen ionisierbarer Gruppen berücksichtigt. Ionisierbare Gruppen sind allerdings für die Permeabilitätsrate von höchster Bedeutung. Deswegen empfehlen VEBER *et al.* die orale Bioverfügbarkeit anhand der molekularen Flexibilität und der PSA oder der Summe aus HBA und HBD abzuschätzen.²⁴²

Anstelle des aufwendig zu bestimmenden PSA-Werts einer 3D-Molekülstruktur wird häufig der von ERTL *et al.* definierte TPSA (*topological PSA*)-Wert genutzt. Hierbei werden Molekülfragmenten tabellierte PSA-Werte zugewiesen, die aufsummiert die TPSA ergeben.²⁴³

Die Beachtung der physikochemischen Parameter ist dementsprechend in der frühen Wirkstoffentwicklung essenziell und wird in der Fachliteratur vielfältig diskutiert.

1.8.1 Löslichkeit

Die Löslichkeit in Wasser oder wässrigen Medien ist ein wichtiger Parameter, der die Pharmakokinetik beeinflusst. Schwer lösliche Stoffe werden schlecht resorbiert. Zum Teil sind aufwendige technologische Formulierungen nötig, um schwer lösliche Wirkstoffe dem Organismus zugänglich machen zu können. Allerdings ist dies mit einem enormen Kosten- und Zeitaufwand verbunden, sodass die Löslichkeit schon früh beachtet werden sollte. Bereits in den biologischen Assays präklinischer Versuche ist eine ausreichende Löslichkeit von Bedeutung, um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten.²⁴⁴

Als Löslichkeit wird unter definierten chemischen und physikalischen Bedingungen diejenige Konzentration in einer Lösung bezeichnet, bei der sich ein Gleichgewicht zur überschüssigen stabilsten Kristallform ausbildet.²⁴⁴ Hierbei spielen intra- und intermolekulare Wechselwirkungen eine Rolle.²⁴⁴ Die Löslichkeit ist von vielen Faktoren wie dem pH-Wert, dem Lösemittel, der Zugabe von Cosolventien (z. B. DMSO) oder Additiven (z. B. Cyclodextrine, Gallensalze, Tenside), ionischer Zusätze, der Inkubationszeit und der Temperatur abhängig.²⁴⁴

Unterschieden wird die thermodynamische Löslichkeit von der kinetischen Löslichkeit. Letztere stellt die maximale Konzentration der am schnellsten präzipitierenden Form einer Verbindung dar.^{245,246} Die thermodynamische Löslichkeit ist die maximale Konzentration einer Verbindung, die im Gleichgewicht zu ihrer stabilsten ungelösten Form vorliegt.²⁴⁷

Die Bewertung der Löslichkeit erfolgt je nach Definition unterschiedlich. So werden Verbindungen mit weniger als 10 µg/mL als schlecht löslich, 10–100 µg/mL als teilweise löslich und größer als 100 µg/mL als gut löslich eingestuft.²⁴⁸ GLOMME berichtet, dass Verbindungen mit einer Löslichkeit von mehr als 100 µg/mL geeignete Wirkstoffkandidaten darstellen. Dagegen kann bereits bei einer Löslichkeit von 1–100 µg/mL eine besondere Formulierung für die Applikation des Wirkstoffs notwendig werden. Verbindungen mit einer Löslichkeit von unter 1 µg/mL werden als ungeeignete Wirkstoffkandidaten eingestuft.²⁴⁹ KERNS empfiehlt eine Mindestlöslichkeit von 60 µg/mL, die sich aus einer benötigten Dosis von 1 mg/mL und einer mittleren Permeabilität errechnet.²⁴⁴ Diese Empfehlung beruht auf LIPINSKIS Untersuchungen, der die Mindestlöslichkeit in Abhängigkeit von der Permeabilität und der benötigten Dosis publiziert hat.²⁵⁰

Dementsprechend erscheint es sinnvoll, die notwendige Löslichkeit in Abhängigkeit von der Aktivität und der Membranpermeabilität des Wirkstoffkandidaten zu definieren.

Eine einfache Methode, um indirekt Rückschlüsse über die Löslichkeit zu erhalten, ist die Bestimmung der Lipophilie über den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow} -Wert oder P-Wert, *partition coefficient*). Dieser intrinsische Wert beschreibt die Verteilung einer nicht-ionisierten Verbindung zwischen den beiden Phasen.²⁵¹ Lipophilie und Hydrophobizität werden etymologisch oft synonym verwendet.²⁵¹ Die Lipophilie stellt jedoch die Differenz aus der Hydrophobizität und Polarität dar.²⁵² Der logP-Wert ist weiterhin ein wichtiger Faktor um Entropie-gesteuerte, nicht-spezifische Bindungen einzuschätzen.²⁴¹ Die effektive Lipophilie, ausgedrückt durch den Distributionskoeffizienten (D-Wert, *distribution coefficient*), wird durch die Verteilung einer Substanz zwischen zwei festgelegten Phasen bei einem bestimmten pH-Wert definiert und ist vom pK_A -Wert der Substanz abhängig.²⁵¹

Dass die Lipophilie und Kristallenergie einer Verbindung mit der Löslichkeit korrelieren, wird an der häufig genutzten Löslichkeitsgleichung nach JAIN und YALKOWSKY deutlich (*General Solubility Equation*, GSE, Formel 1-1).²⁵³

Formel 1-1: Löslichkeitsvorhersage nach JAIN und YALKOWSKY.²⁵³

$$\log S_0 = 0.5 - \log P - 0.01 \times (MP - 25)$$

Diese haben durch Modifikation der Gleichung der zuvor von YALKOWSKY und VALVANI veröffentlichten GSE²⁵⁴ den mittleren absoluten Fehler von 0.69 log-Einheiten auf 0.44 log-Einheiten senken können. Der $\log S_0$ -Wert ist der dekadische Logarithmus der molaren Löslichkeit in mol/L. Dieser Wert gilt für die neutrale Form der Moleküle. Der Term $[-0.01 \times (MP - 25)]$ bildet die Kristallinität bei Festsubstanzen ab. MP stellt den Schmelzpunkt dar.²⁵³

Hoch geordnete Kristallstrukturen weisen oft hohe Schmelzpunkte auf, die mit einer schlechten Löslichkeit einhergehen können.²⁵⁵ Ursächlich hierfür sind u.a. starke kohäsive Interaktionen in Folge von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, dicht gepackten Strukturen sowie kurzreichenden Van-der-Waals-Dispersionskräften. Dabei treten starke Kohäsionskräfte vermehrt in Verbindungen mit einer hohen Anzahl an HBA und HBD oder bei planaren, starren oder symmetrischen Konformationen auf.^{246,256} THOMAS *et al.* zufolge sind Verbindungen mit einem Schmelzpunkt von über 250 °C mit einer schlechten thermodynamischen Löslichkeit verbunden.²³⁵ CHU und YALKOWSKY konnten zeigen, dass über den Schmelzpunkt zusätzlich die Absorption vorhergesagt werden kann.²⁵⁷

Eine Alternative um die Löslichkeit von Verbindungen ohne bekannten Schmelzpunkt zu bestimmen, stellt die von DELANEY veröffentlichte ESOL (*Estimated Solubility*)-Gleichung dar (Formel 1-2).²⁵⁸

Formel 1-2: Vorhersage der Löslichkeit mittels ESOL-Gleichung nach DELANEY.²⁵⁸

$$\log S = 0.16 - 0.63 \times \text{clogP} - 0.0062 \times M_r + 0.066 \times \text{RB} - 0.74 \times \text{AP}$$

Hierbei wird neben dem clogP-Wert die relative Molmasse (M_r), die Anzahl an rotierbaren Bindungen (RB) und der aromatische Anteil (AP, *aromatic proportion*; Anteil Nicht-Wasserstoffatome, die in aromatischen Systemen inkorporiert sind) miteinbezogen. Die nach Anwendung der ESOL-Gleichung erhaltenen Werte waren besonders für große Moleküle vergleichbar zu den Werten, die mittels GSE berechnet wurden.²⁵⁸

Die Löslichkeitsvorhersage nach ALI *et al.* sieht des Weiteren die Einbeziehung der TPSA (*topographical polar surface area*) vor (Formel 1-3). Dieser Parameter sollte zunächst als Ersatz für den experimentell zu ermittelnden Schmelzpunkt genutzt werden. Allerdings konnten durch die Verwendung der TPSA in Verbindung mit dem Schmelzpunkt ähnliche Löslichkeitswerte erhalten werden, wie mit der GSE-Gleichung.²⁵⁹

Formel 1-3: Löslichkeitsvorhersage nach ALI *et al.*²⁵⁹

$$\log S = -1.0144 \times \log P - 0.0056 \times (\text{MP} - 25) - 0.0134 \times \text{TPSA} + 0.5134$$

Da der pH-Wert des Magens sich wesentlich vom pH-Wert des Blutes unterscheidet, ist die Einbeziehung der vorliegenden Molekülform wichtig für die Löslichkeitsvorhersage. Ein erhöhter Ionisationsgrad reduziert den logD-Wert und führt so zu einer erhöhten effektiven Löslichkeit.²⁵¹ Hoch lipophile Substanzen ($\log D > 5$) weisen neben einer schlechten Wasserlöslichkeit auch eine erhöhte Tendenz für unspezifische Bindungen auf. Sie unterliegen weiterhin vermehrt der CYP450-Metabolisierung und können stärker an Plasmaproteine gebunden werden. Moderat lipophile Substanzen ($0 < \log D < 3$) weisen dagegen eine gute Balance zwischen Löslichkeit und Membranpermeabilität auf. Verbindungen mit einem logD-Wert von etwa zwei weisen zusätzlich eine besonders gute Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität auf. Sehr gut lösliche Verbindungen ($\log D < 0$) besitzen hingegen eine schlechte Permeabilität und werden schnell renal eliminiert.²³⁹ HILL und YOUNG konnten zeigen, dass experimentell bestimmte $\log D_{\text{pH}7.4}$ -Werte gering löslicher Verbindungen ($< 30 \mu\text{M}$) schlecht mit berechneten $\text{clogD}_{\text{pH}7.4}$ -Werten übereinstimmen.²⁵¹ Die Autoren vermuten, dass schwer lösliche Verbindungen eine hohe Tendenz zur Agglomeration aufweisen. Folglich ist der berechnete logD-Wert ein besserer Indikator der wahren Lipophilie als der experimentell ermittelte Wert. Sie empfehlen zur Einschätzung der Löslichkeit den Löslichkeits-Vorhersage-Index (*Solubility Forecast Index*, SFI, Formel 1-4).²⁵¹

Formel 1-4: Löslichkeitsabschätzung nach HILL und YOUNG.²⁵¹

$$clog(D_{pH\ 7.4}) + \#Ar < 5$$

#Ar entspricht der Anzahl (hetero-)aromatischer Ringe, wobei die Ringe in anellierten Ringsystemen individuell gezählt werden. Wenn die Bedingung erfüllt ist, kann von einem gut löslichen Wirkstoffkandidaten ausgegangen werden.²⁵¹ Berücksichtigt wird hier allerdings nicht die unterschiedliche Polarität diverser Ringsysteme, die einen großen Einfluss auf die Löslichkeit ausüben.²⁶⁰

Zusätzlich ermöglicht die Modifikation der Henderson-Hasselbalch-Gleichung die Löslichkeit polarer Verbindungen in Abhängigkeit des pK_A- und pH-Werts vorherzusagen (Formel 1-5).²⁶¹

Formel 1-5: Modifizierte Henderson-Hasselbalch-Gleichung zur Abschätzung der Löslichkeit saurer oder basischer Verbindungen in Abhängigkeit vom pH- und pK_A-Wert.

$$S = S_0 \times (1 + 10^{pH-pK_A}) \text{ für Säuren}$$

$$S = S_0 \times (1 + 10^{pK_A-pH}) \text{ für Basen}$$

S₀ stellt die intrinsische Löslichkeit (Löslichkeit der neutralen Form) dar. Für ionisierbare Verbindungen werden mit diesen Formeln wesentlich höhere Löslichkeitswerte erzielt als für neutrale Substanzen.

Die Löslichkeit kann folglich durch eine Vielzahl an Berechnungsmethoden vorhergesagt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zur Vorhersage der Löslichkeit auf Basis struktureller Parameter kinetische und thermodynamische Löslichkeitsmessungen durchgeführt. Diese beiden Verfahren werden in Kapitel 7 erläutert.

Durch Substitution lipophiler aromatischer Substituenten durch aliphatische Reste sowie die Erweiterung um basische Strukturelemente sollte die Löslichkeit der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide gesteigert werden. In ähnlicher Weise wurde bei der Entwicklung des antiplasmodialen Entwicklungskandidaten DDD107498 (**40a**) durch Inkorporation ionisierbarer Substituenten in DDD102542 (**39e**) sowohl die Löslichkeit als auch die Aktivität erhöht (Abbildung 1-16).²⁶²

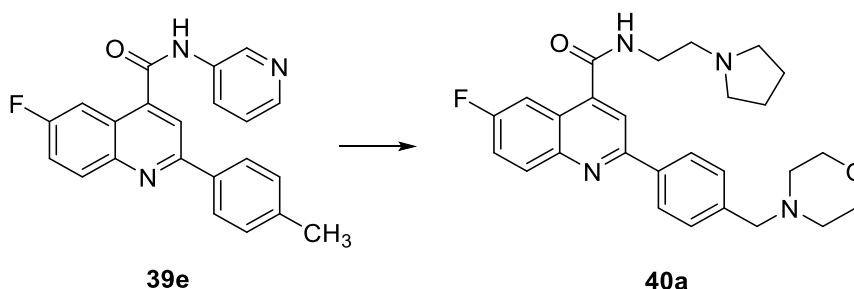


Abbildung 1-16: Löslichkeitsverbesserung von DDD102542 (**39e**) durch Einführung ionisierbarer Strukturen führte zum Entwicklungskandidaten DDD107498 (**40a**).²⁶²

1.8.2 Ligand efficiency und lipophilic ligand efficiency

Hou *et al.* konnten zeigen, dass die alleinige Betrachtung molekularer Eigenschaften für die Bewertung der oralen Bioverfügbarkeit unzureichend ist.²⁶³ Die *ligand efficiency* (LE) und die *lipophilic ligand efficiency* (LLE) sind weitere Parameter, um die *druglikeness* in der frühen Wirkstoffentwicklung zu bewerten. Hierbei wird neben den molekularen Eigenschaften zusätzlich die biologische Aktivität berücksichtigt.^{241,264}

Der LE-Wert stellt die experimentelle Bindungsenergie pro schwerem Atom (HA, *heavy atom*; Nicht-Wasserstoffatom) dar.²⁶⁴ Auf dieser Grundlage kann eingeschätzt werden, wie effizient das Molekül an die Zielstruktur bindet. Die Parameter beruhen auf der freien Bindungsenergie nach Gibbs ($\Delta G^0 = -RT \times \ln(K_d/C^0)$). Unter Annahme der Standardbedingungen von 300 K, einer Konzentration von 1 M und einem neutralen pH-Wert kann die freie Bindungsenergie pro schwerem Atom näherungsweise mit -1.37 kcal/mol angenommen werden. Anstelle der selten experimentell ermittelten Dissoziationskonstante (K_d) kann der negativ dekadische Logarithmus der mittleren inhibitorischen Konzentration (pIC_{50}) genutzt werden. Zum besseren Vergleich der LE-Daten verschiedener Verbindungen sollten die IC_{50} -Werte in biologischen Assays generiert worden sein, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden sind.²⁶⁴

Formel 1-6: Gleichung für die Berechnung der LE.²⁶⁴

$$LE = \frac{\Delta G}{HA} \approx \frac{1.37 \text{ kcal/mol}}{HA} \times pIC_{50}$$

Der LE-Wert sollte für Wirkstoffkandidaten über ~0.3 [kcal/mol]/HA liegen.^{264,265} In Studien konnte gezeigt werden, dass optimale LE-Werte für kleine Liganden stets größer sind als für große Liganden. Dieses Phänomen ist mit der geringeren für die Bindung zur Verfügung stehenden Oberfläche großer Moleküle im Vergleich zu kleinen Molekülen zu erklären. Diese weisen eine höhere strukturelle Komplexität auf und einzelne Atome sind weniger zugänglich für Bindungen.²⁶⁶

Zusätzlich ist die willkürliche Wahl der Standardkonzentration von 1 M im Gibbs-Term bedenklich. Durch die Logarithmusfunktion führen kleine Abweichungen dieser Standardkonzentration zu großen Änderungen des LE-Werts.²⁶⁷

Als weiterer Kompositparameter hat sich deshalb der LLE-Wert etabliert. Der LLE-Wert schätzt die Affinität der Verbindung hinsichtlich des Targets gegenüber einer Oktanol-Phase ein.²⁶⁴ Dabei wird die Differenz der biologischen Aktivität und der Lipophilie gebildet.²⁶⁴ Eine Abhängigkeit von der Standardkonzentration ist hier nicht mehr gegeben. Auch steht die LLE in einem linearen Verhältnis zu $clogP$.

Formel 1-7: Berechnung der *lipophilic ligand efficiency* (LLE).²⁶⁴

$$LLE = pIC_{50} - clogP$$

Der LLE-Wert sollte größer als fünf sein.²⁴¹ Anstelle des pIC_{50} -Werts wird auch der pK_i -Wert genutzt. Auch kann der $\log D$ -Wert, welcher wiederum vom pH-Wert abhängig ist, anstelle des $clogP$ -Wertes verwendet werden. Aufgrund der Heterogenität der verwendeten Parameter ist ein direkter Vergleich von LLE-Werten nur bedingt möglich.²⁶⁸

In der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung ist neben der Steigerung der Aktivität die Berücksichtigung der physikochemischen Parameter von essenzieller Bedeutung. Die Kombination dieser beiden Parameter wird zur Evaluierung der *druglikeness* verwendet. Die Aussage dieser Kompositparameter ist kritisch zu hinterfragen. So sollte der Vergleich der LE-Werte nur bei vergleichbar generierten IC_{50} -Werten erfolgen. Die Vorhersagemethoden ermöglichen es allerdings, Arbeit, Zeit und Geld zu sparen und die Anzahl tatsächlich neu herzustellender Derivate, die dann experimentell untersucht werden, zu reduzieren.

2 Zielsetzung

Die von FUGEL *et al.* berichtete fehlende *Pf*GSK-3-Inhibition durch das 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid **42** ist im Hinblick auf die gute *Pf*GSK-3-Inhibition durch die strukturverwandten Keton-Analoga **39** erstaunlich.¹⁷⁴ In Proliferationsassays mit *P. falciparum* 3D7 infizierten Erythrozyten wurde für **42** ein IC₅₀-Wert von 199.3 nM ermittelt.²⁶⁹

Die antiplasmodiale Aktivität trotz fehlender *Pf*GSK-3-Inhibition der von **42** repräsentierten Wirkstoffklasse sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu sollte mit Hilfe von *docking*-Experimenten nach einer Erklärung für die fehlende *Pf*GSK-3-Inhibition der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide gesucht werden. Hierfür standen unterschiedliche Homologiemodelle der *Pf*GSK-3 zur Verfügung. Diese sollten zunächst durch den Vergleich ihrer ATP-Bindetaschen gegenübergestellt und ein aussagekräftiges Modell ausgewählt werden. In dem ausgewählten Modell sollte die Lage verschiedener Verbindungen in der Bindetasche untersucht und bewertet werden.

Die Synthese weiterer 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide sollte mit dem Ziel erfolgen, sowohl deren biologische Aktivität an *P. falciparum* zu steigern, als auch die Löslichkeit in wässrigen Medien zu verbessern. Im Rahmen von Strukturmodifikationen sollte die von FUGEL¹⁷⁴ berichtete Notwendigkeit des *ortho*-Chlor-Substituenten am 4-Phenylring untersucht werden. Auch der Einfluss des 3-Chlorbenzoyl-Restes sollte u.a. durch Ersatz mit aliphatischen Substituenten beurteilt werden. Weiterhin sollten basische Gruppen in die *para*-Position des 4-Phenyl-Substituenten eingeführt werden. Diesbezüglich konnte MASCH²⁷⁰ bereits zeigen, dass in der Serie der von **44** abgeleiteten Strukturen die antiplasmodiale Wirkung beibehalten wird (Tabelle 1-3). Des Weiteren sollte die 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur durch aliphatische Anellanden oder Carbonyl-Substituenten ersetzt und so deren Einfluss auf die biologische Aktivität untersucht werden. Darüber hinaus bot diese Variation die Möglichkeit, durch eine Erhöhung des sp³/sp²-Verhältnisses die Löslichkeit zu steigern.

Durch Bestimmung der thermodynamischen und kinetischen Löslichkeit sollten die physikochemischen Eigenschaften neuer Verbindungen bewertet werden. Diese experimentellen Werte sollten, auch im Vergleich mit theoretisch vorhergesagten Löslichkeitswerten, zur Einschätzung der *druglikeness* dienen.

Zusätzlich sollte die Stabilität ausgewählter Verbindungen bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert werden. Antimalariawirkstoffe werden hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen zum Einsatz kommen. Somit ist eine ausreichende Lagerfähigkeit auch unter den dort herrschenden äußeren Bedingungen von Bedeutung.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 2-1 die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit geplanten Strukturmodifikationen der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide im Überblick.

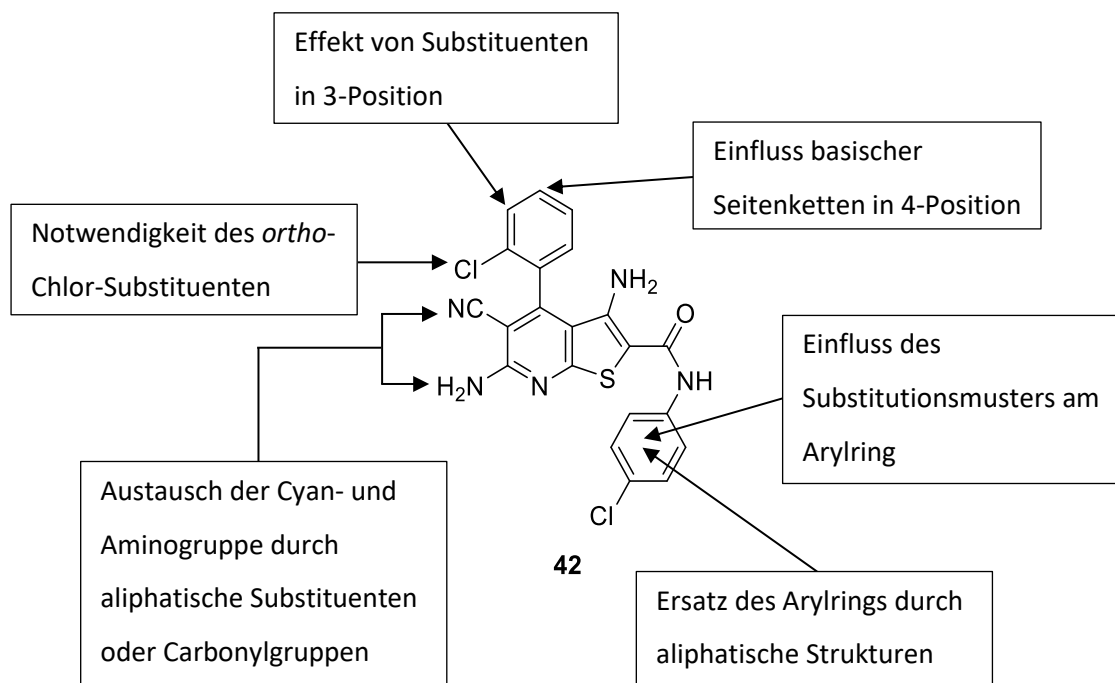


Abbildung 2-1: Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit geplanten Strukturmodifikationen zur Untersuchung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen und Struktur-Wirkungsbeziehungen.

3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Aus Screening-Kampagnen hervorgegangene Hit-Strukturen können mit Hilfe des strukturbasierten Wirkstoffdesigns optimiert werden. Die Struktur des Targets muss hierfür bekannt sein. Durch Röntgenstrukturanalysen kann ein kristallisiertes Target visualisiert werden. Ein mit Ligand kristallisiertes Protein nennt man Kokristallinat. Die Stammdaten der Kristallstrukturen sind in der Proteindatenbank (PDB) im Internet frei zugänglich und können mit verschiedenen Software-Programmen abgebildet werden. So können mögliche Bindestellen des Targets identifiziert und die Lage des Liganden analysiert werden. Außerdem können wichtige Interaktionen zum Target detektiert und Rückschlüsse für Strukturoptimierungen getroffen werden. Durch Einführung von Substituenten an den Liganden können anschließend noch nicht adressierte Proteinbindestellen ausgenutzt und so die Aktivität der Verbindung erhöht werden. Zusätzlich kann an Positionen des Liganden, die dem Lösungsmittel zugewandt sind, die Löslichkeit durch Inkorporation hydrophiler Substituenten gesteigert werden. Nach Extraktion des Liganden und Einfügen einer *in silico*-Verbindung ist eine Untersuchung von potenziellen Bindungsgeometrien möglich. Dieses Vorgehen wird *docking* genannt. Mit Hilfe einer *scoring*-Funktion wird der Energieinhalt von geometrischen Anordnungen quantifiziert und dadurch vergleichbar gemacht.²⁷¹ Bei fehlender Kristallstruktur des Targets kann auf Grundlage eines homologen Proteins ein Homologiemodell generiert werden. Dabei sollte die Sequenzidentität optimalerweise mehr als 90% betragen. Ab einer Sequenzidentität von 25-30% ist das Erkennen einer Strukturhomologie kritisch zu bewerten.²⁷¹ Solche Homologiemodelle können ebenfalls für *docking*-Studien genutzt werden.

Mittlerweile gibt es mehr als 60 verschiedene *docking*-Programme.^{272,273} In der vorliegenden Arbeit wurde das *docking*-Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) verwendet, welches auf einem genetischen Algorithmus (GA) beruht. Dabei werden verschiedene Ligandenposen durch eine Population von sog. Chromosomen repräsentiert. Die Position eines Liganden in Relation zum Enzym wird durch Zustandsvariable, sog. Gene, beschrieben. Hierzu gehören die Orientierung, die Translation und die Konformation. Diese Variablen stellen den Genotyp dar. Der Phänotyp wird durch die atomaren Koordinaten des Liganden beschrieben. Durch Mutation, Kreuzungen und Migration der Gene werden so lange verschiedene Konformationen evaluiert, bis optimierte Positionen hinsichtlich der Bindungsgeometrie und Affinität erhalten werden.^{1,273,274}

GOLD zeichnet sich durch flexible Liganden aus, die in partiell flexible Targets gedockt werden.²⁷⁵ Die Flexibilität ist hauptsächlich durch rotierbare Serin-, Threonin- und Tyrosin-Hydroxyl-Gruppen gegeben. Auch rotierbare NH_3^+ -Gruppen des Lysins, sofern diese nicht durch starke Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Aminosäuren fixiert sind, tragen hierzu bei. Allerdings kann das Protein ebenso in einer starren Konformation genutzt werden.

Wenn zusätzliche Seitenketten flexibel behandelt werden, können aufgrund der erhöhten Anzahl an Bindungsmöglichkeiten falsch positive Ergebnisse erhalten werden.²⁷⁶ Zur Bewertung der Posen wurde in der vorliegenden Arbeit als *scoring*-Funktion der empirische ChemScore herangezogen. Dieser berücksichtigt zur Bestimmung der totalen freien Energie neben Wasserstoffbrückenbindungen auch lipophile Wechselwirkungen, Atomradien, Polarisierbarkeiten, Torsionspotentiale sowie über Metallionen vermittelte Interaktionen. Kollisionen des Liganden mit dem Target, definierte Restriktionen oder Behinderungen des Liganden-Protein-Komplexes durch nicht geeignete interne Torsionswinkel mindern den ChemScore.²⁷⁶ In einer Studie von PAGADALA *et al.* konnte die Genauigkeit von GOLD anhand einer Thymidinkinase und einem Estrogen-Rezeptor auf 60% ermittelt werden. Der RMSD-Wert (*root mean square deviation*) betrug unter 1.2 Å. Damit übertraf GOLD bewährte Programme wie Dock oder FlexX.²⁷² Der RMSD-Wert ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der *docking*-Position und dem experimentell generierten Bindemodus und sollte für brauchbare Vorhersagen max. 2 Å betragen.²⁷⁷

3.1 Homologiemodelle der PfGSK-3

Aufgrund der schlechten Kristallisationseigenschaften der plasmodialen GSK-3 existieren diverse Homologiemodelle auf Grundlage der humanen GSK-3.²²¹ Für diese Arbeit standen drei dieser Homologiemodelle zur Verfügung, die zur Analyse der Position der 4-Arylthieno[2,3-*b*]pyridine in der Bindetasche der PfGSK-3 herangezogen wurden. Diese Homologiemodelle beruhen auf Kristallstrukturen der humanen Isoform GSK-3β (PDB: 1J1B²⁷⁸, 2OW3²⁷⁹ und 3ZDI¹⁷⁴). Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung (Abschnitt 1.7.1.1) stellt die HsGSK-3β eine geeignete Grundlage zur Generierung eines Homologiemodells dar.

Die Homologiemodelle wurden zunächst auf Unterschiede der Bindetaschen gegenüber der HsGSK-3-Kristallstruktur untersucht. Dabei fiel auf, dass die Bindetasche der HsGSK-3 im rechten hinteren Bereich ein Wassermolekül enthält (Abbildung 3-1|A). Durch die *toggle*-Funktion von GOLD kann dieses Wassermolekül je nach Bindungsgeometrie des Liganden an- oder abgeschaltet werden, sodass dieser Bereich potenziell für den Liganden zur Verfügung steht. Dieses Wassermolekül ist in dem Homologiemodell basierend auf dem Template 3ZDI¹⁷⁴ nicht in der Bindetasche inkludiert (Abbildung 3-1|B). Deshalb ragen bei Verwendung dieses Modells die Verbindungen weiter aus der Bindetasche heraus. Ein direkter Vergleich mit der Position des Liganden der Kristallstruktur ist hier erschwert. Das Homologiemodell basierend auf dem Template 2OW3²⁷⁹ zeigt die geringste Ähnlichkeit zur Bindetasche der Kristallstruktur. Allerdings befindet sich hierbei das Wassermolekül in der Bindetasche (Abbildung 3-1|C). Da die Bindetasche in diesem Homologiemodell im Vergleich zur Kristallstruktur der HsGSK-3β stark erweitert ist, kann bei dessen Verwendung eine große Anzahl möglicher Bindemodi

generiert werden. Somit ist der direkte Vergleich zur Position des Liganden in der Kristallstruktur ebenso erschwert. Im letzten Homologiemodell, welches auf dem Template 1J1B²⁷⁸ beruht, ist das Wassermolekül ähnlich wie in der Bindetasche der Kristallstruktur vorhanden (Abbildung 3-1|D). Zusätzlich zeigt die Bindetasche die höchste Übereinstimmung zur Bindetasche der Kristallstruktur, weshalb im Folgenden dieses Modell zum Vergleich der Positionen der verschiedenen 4-Arylthieno[2,3-*b*]pyridine in der PfGSK-3 herangezogen wurde.

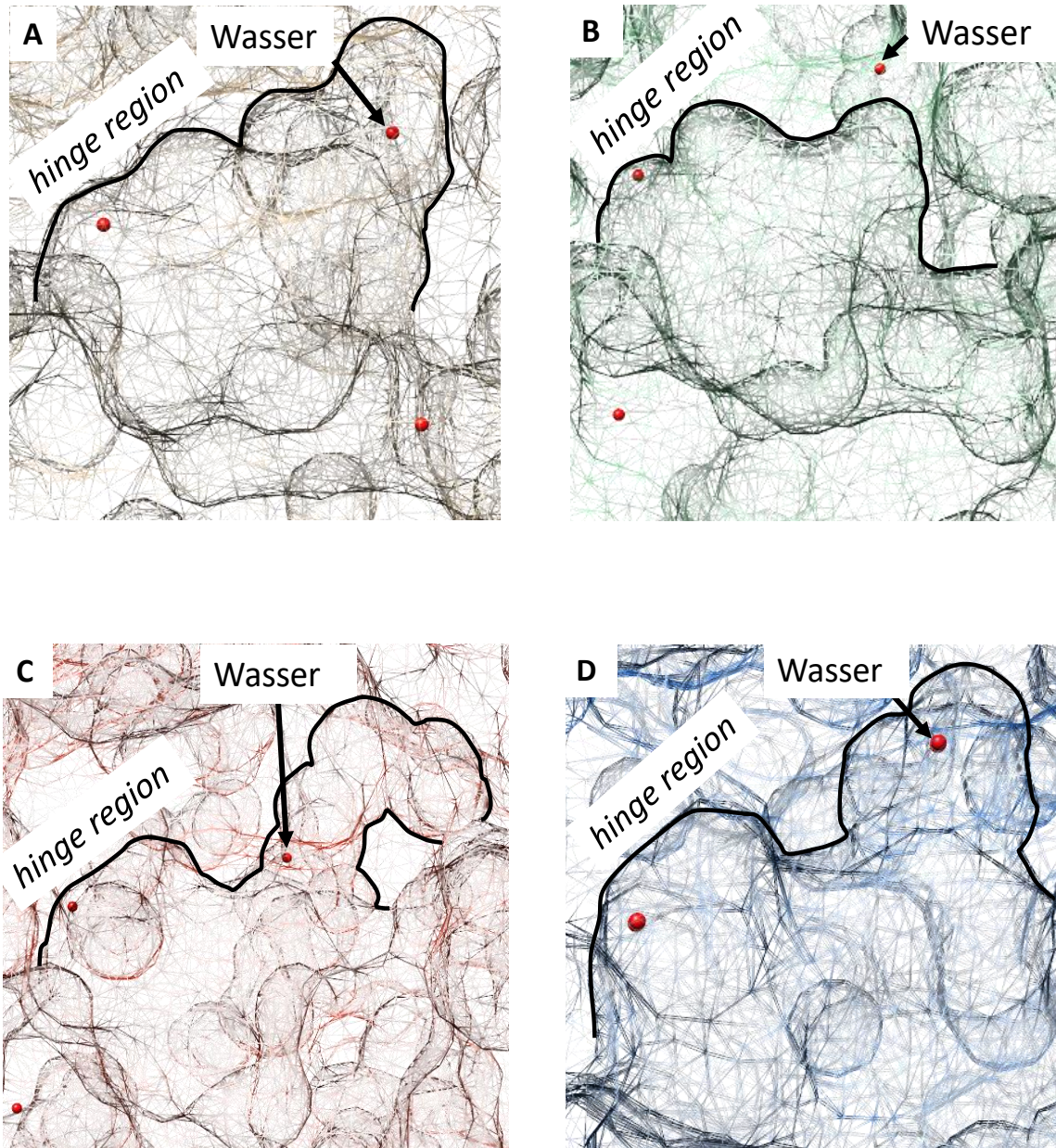


Abbildung 3-1: Visualisierung der untersuchten Bindetaschen der unterschiedlichen Homologiemodelle basierend auf den Templates der Proteindatenbank 3ZDI¹⁷⁴ (B), 2OW3²⁷⁹ (C) und 1J1B²⁷⁸ (D). Diese wurden mit der Kristallstruktur der HsGSK-3 (PDB: 3ZDI¹⁷⁴, A) verglichen.

3.2 Bindemodus der Kokristallstruktur in der *HsGSK-3*

Da eine Kokristallstruktur der *HsGSK-3* β mit einem 4-Arylthieno[2,3-*b*]pyridin-Liganden über die Proteindatenbank zur Verfügung stand (PDB: 3ZDI¹⁷⁴), wurde zur Einschätzung der vorliegenden Analysen zunächst die experimentell erhaltene Lage der Verbindung **36** in der Bindetasche untersucht.

Das dargestellte Thieno[2,3-*b*]pyridin **36** adressiert die *hinge region* der *HsGSK-3* (Abbildung 3-2). Es kann eine Vielzahl an Interaktionen zur Bindetasche der *HsGSK-3* ausgemacht werden. Hierzu gehört die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 6-Aminogruppe des Inhibitors und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Val135 (*gk*+3) der *hinge region*. Über ein Wassermolekül werden weiterhin Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Stickstoffatom des Pyridins und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Asp133 (*gk*+1) sowie zum Stickstoffatom des Val135 vermittelt. Die 3-Amino-2-cyan-Einheit adressiert die ϵ -Aminogruppe des konservierten Lys85 und die Seitenkette des Asp200. Der senkrecht zum Grundkörper angeordnete 4-Aryl-Substituent übt hydrophobe Wechselwirkungen zum Glu85 und Asn186 am Boden der ATP-Bindetasche aus. Der 2-Chlor-Substituent füllt die Decke der Bindetasche aus (Abbildung 3-2). Durch die vielen Wechselwirkungen zwischen **36** und dem aktiven Zentrum der *HsGSK-3* kann die inhibitorische Aktivität von **36** erklärt werden (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3).

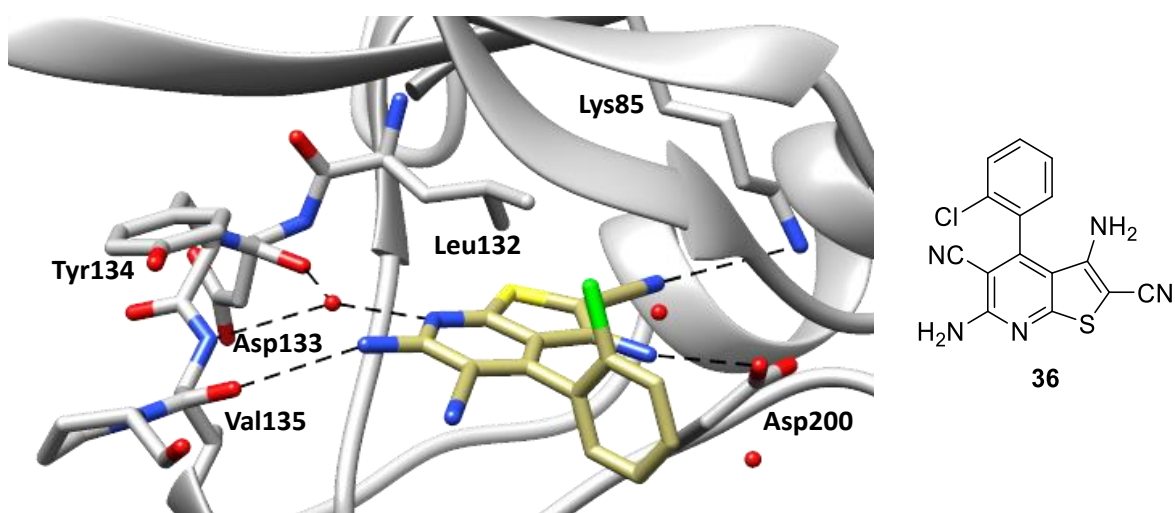


Abbildung 3-2: Darstellung der Kokristallstruktur des Thieno[2,3-*b*]pyridins **36** in der Bindetasche der *HsGSK-3* β . Die schwarz unterbrochenen Linien stellen polare Wechselwirkungen dar. Kohlenstoffatome des Liganden sind goldgelb visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

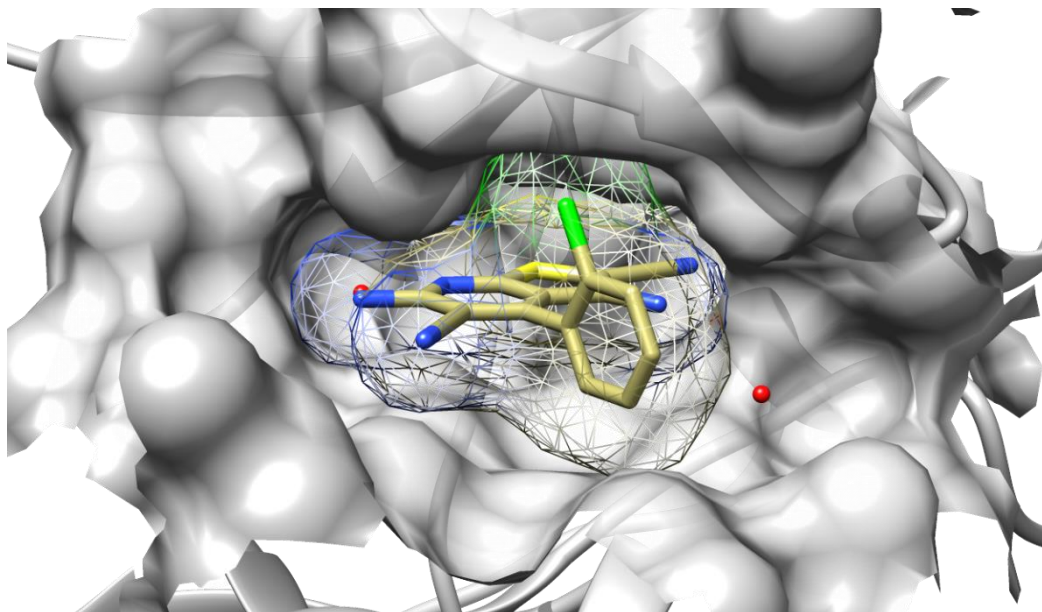


Abbildung 3-3: Visualisierung der Oberflächenstrukturen der Bindetasche und des Liganden **36**. Kohlenstoffatome des Liganden sind goldgelb visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

3.3 *docking*-Experimente mit **39b**

FUGEL *et al.* identifizierten mit **39b** einen selektiven und potenten *Pf*GSK-3-Inhibitor.¹⁷⁴ Im Gegensatz zum kokristallisierten Thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbonitril **36** weist diese Verbindung nun eine Benzoylgruppe anstelle der 2-Carbonitril-Gruppe auf. Mit *molecular-docking*-Experimenten konnten die Autoren im Vergleich zur Kristallstruktur eine um 30° gedrehte Position in der *Pf*GSK-3 detektieren, die auf die raumeinnehmende Carbonylgruppe zurückzuführen ist. Es wurden zu dem Liganden in der Kristallstruktur vergleichbare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem 6-Amino-Substituenten und dem Ile160 der *hinge region* sowie über das Wassermolekül zu Glu158 und Tyr159 detektiert. Die Carbonyl-Struktur interagiert mit der ε-Amino-Gruppe des konservierten Lys108. Der 4-Phenyl-Substituent ist senkrecht zum Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörper angeordnet. Der *ortho*-Chlor-Substituent adressiert allerdings den Boden der Bindetasche.¹⁷⁴ Dieser Bereich wurde durch molekulare Interaktionsfeldberechnungen als potenzieller Interaktionspunkt für Halogene detektiert.²⁸⁰ Darüber hinaus konnten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem *gatekeeper* (Met157) und dem Thiophen-Schwefel analysiert werden. Diese Interaktionen begründen die hohe Aktivität der dargestellten Verbindung an der *Pf*GSK-3.¹⁷⁴

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde bei *docking*-Untersuchungen von **39b** in dem vorliegenden Homologiemodell die von FUGEL *et al.*¹⁷⁴ beschriebene Position rekonstruiert (Abbildung 3-4; Abbildung 3-5). Dabei wurden die publizierten Interaktionen wiedergefunden, durch die die hohe Aktivität an der *Pf*GSK-3 begründet wird (Abbildung 3-4).

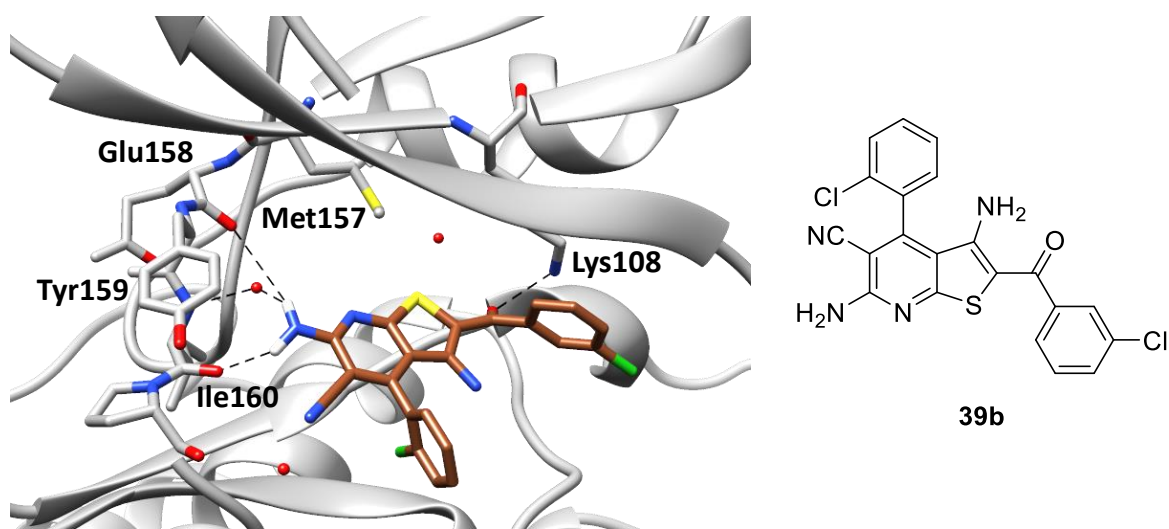


Abbildung 3-4: Durch *docking* mit GOLD vorhergesagter Bindungsmodus von **39b** in der PfGSK-3. Die detektierten polaren Wechselwirkungen sind als unterbrochene schwarze Linien dargestellt. Kohlenstoffatome des Liganden sind braun visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

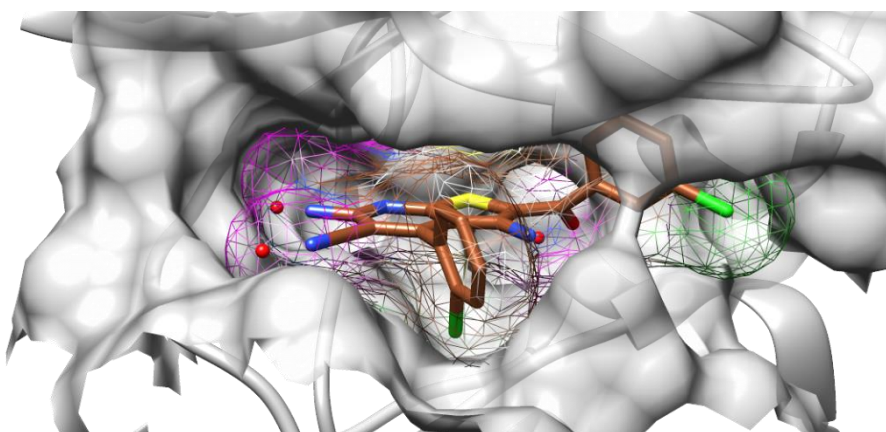


Abbildung 3-5: Durch *docking* mit GOLD erzeugte hypothetische Position von **39b** in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3. Kohlenstoffatome des Liganden sind braun visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

3.4 Bindemodus von 42

39b und **42** unterscheiden sich hauptsächlich in der Carbonyl-Gruppe. **39b** weist hier ein Keton auf, wohingegen **42** eine Amid-Funktion enthält. FUGEL *et al.* berichten, dass durch den Ersatz der Keto-Struktur durch ein Amid ein Verlust der PfGSK-3-Inhibition beobachtet wurde.¹⁷⁴ Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit in *docking*-Experimenten untersucht. Dabei wurde eine um etwa 180° gedrehte Position von **42** in der ATP-Bindetasche detektiert.

Der raumfüllende 4-Chloracetanilid-Substituent ragt zur Lösungsmittelzugewandten Seite. Diese Lage unterscheidet sich deutlich von der Position von **39b** in der ATP-Bindetasche. Bei dieser Orientierung von **42** können keine hydrophilen Wechselwirkungen mit der *hinge region* detektiert werden. Anstelle dessen sind polare Interaktionen zwischen dem Schwefelatom des Thienopyridin-Grundkörpers und der Amino-Gruppe von Gln210 sowie zwischen der 6-Aminogruppe und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Asn87 zu beobachten. Asn87 bildet einen Teil der Glycin-reichen Schleife. Da die Konformation der *G-loop* dynamisch ist und von der Aktivität der katalytischen Domäne abhängt, sind diese Wechselwirkungen möglicherweise nur in der dargestellten Konformation feststellbar. Eine verlässliche Adressierung des Targets ist damit unwahrscheinlich. Die fehlenden hydrophilen Wechselwirkungen zwischen **42** und der *hinge region* erklären den Verlust der Hemmaktivität dieser Verbindung an der PfGSK-3 (Abbildung 3-6, Abbildung 3-7).

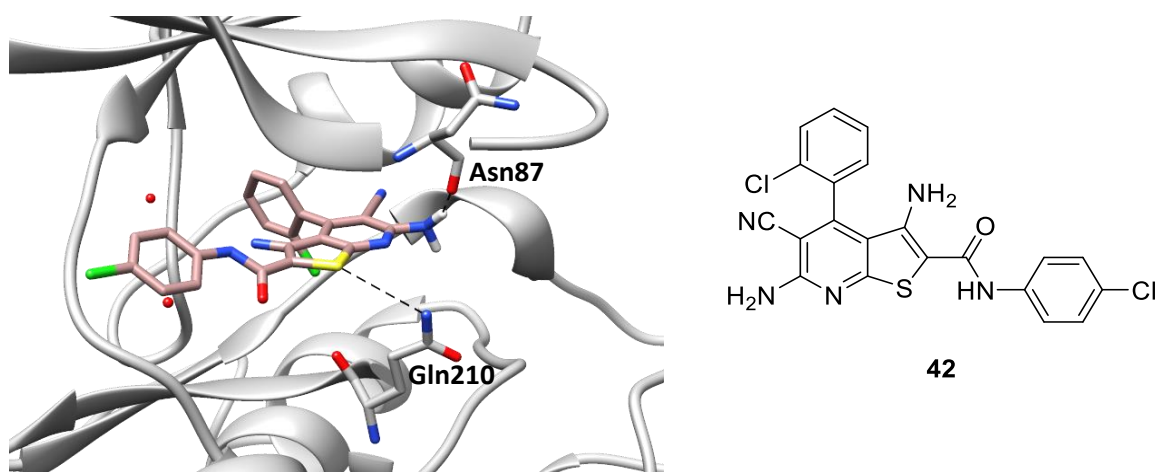


Abbildung 3-6: Durch *docking* mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von **42** in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3. Die detektierten polaren Wechselwirkungen sind als unterbrochene schwarze Linien dargestellt. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind rosa visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

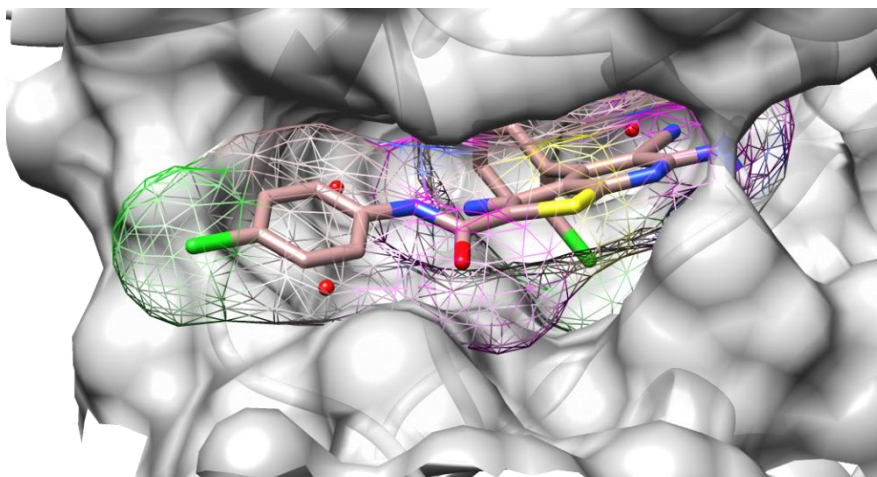


Abbildung 3-7: Durch *docking* mit GOLD erzeugte hypothetische Position von **42** in der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3*. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind rosa visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

3.5 Bindemodus von **46f**

46f stellt die in dieser Arbeit wirksamste Verbindung zur Hemmung der Parasitenvermehrung dar. Eine *PfGSK-3*-Hemmung wurde allerdings nicht detektiert. **46f** ist durch einen anellierten Cyclopentanring an das Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundgerüst gekennzeichnet, der die 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur von **42** ersetzt. Bei *docking*-Versuchen im Homologiemodell der *PfGSK-3* wurde eine um etwa 180° gedrehte Position des Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundkörpers im Vergleich zu **39b** erhalten. Auch bei **46f** ragt der 4-Chloracetanilid-Substituent weit aus der Bindetasche heraus, was durch den raumfüllenden Cyclopentan-Anellanden begründet werden kann. Polare Wechselwirkungen zwischen **46f** und dem aktiven Zentrum der *PfGSK-3* sind in dieser Orientierung nicht zu beobachten. Die daraus resultierende geringe Affinität des Liganden und dadurch fehlende Inhibition der *PfGSK-3* sind somit plausibel (Abbildung 3-8, Abbildung 3-9).

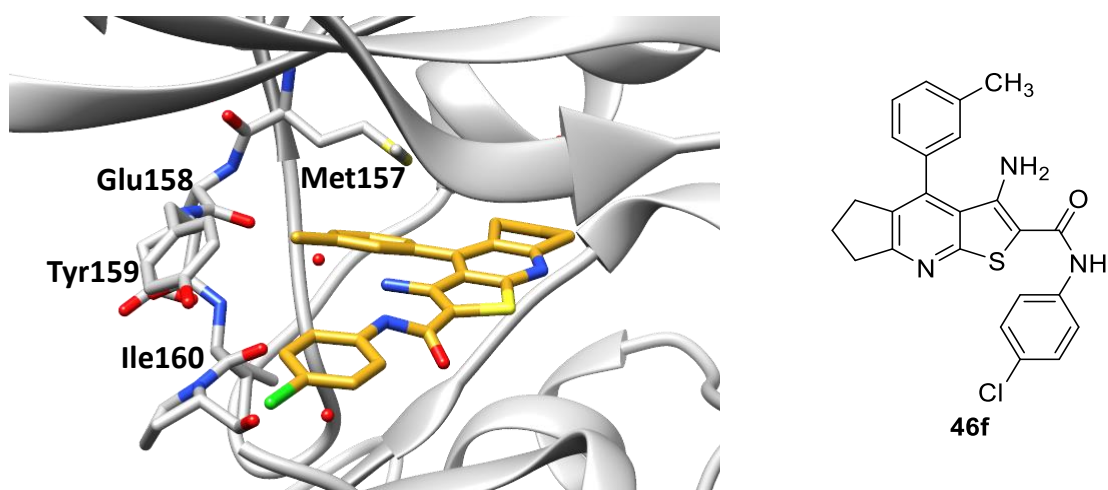


Abbildung 3-8: Durch *docking* mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von **46f** in der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3*. Es wurden keine Wechselwirkungen detektiert. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind gold visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

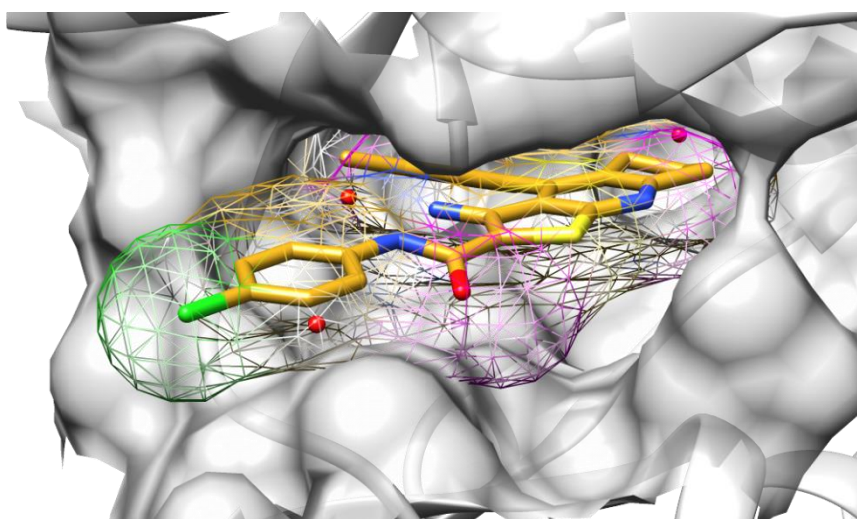


Abbildung 3-9: Durch *docking* mit GOLD erzeugte hypothetische Position von **46f** in der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3*. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind gold visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb; Cl: Grün.

3.6 Bindemodus von **47k**

In den biologischen Testungen wurde für **47k** eine über 50%ige Inhibition der *PfGSK-3* bei einer Konzentration von 10 μ M detektiert. **47k** weist anstelle des raumfüllenden aromatischen 4-Chloracetanilid-Rests einen methylierten Amid-Substituenten auf. Durch *docking*-Analysen wurden mit **47k** vergleichbare Positionen wie mit den Keton-Analogen **39b** erhalten.

Zusätzlich wurde eine Vielzahl an Wechselwirkungen des Liganden mit der ATP-Bindetasche detektiert. Hierzu gehört eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 6-Aminogruppe des Liganden und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Ile160 (*gk*+3). Auch können über das Wassermolekül polare Wechselwirkungen sowohl zwischen der 6-Aminogruppe und dem Amid-Stickstoffatom von Tyr159 (*gk*+2) als auch dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Glu158 (*gk*+1) vermittelt werden. Das Carbonyl-Sauerstoffatom der Amidgruppe von **47k** kann mit der ϵ -Aminogruppe des Lys108 wechselwirken. Der *meta*-Methyl-Substituent füllt den Boden der ATP-Bindetasche aus. Aufgrund der guten Auskleidung der Bindetasche durch die Verbindung sind auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Schwefel und dem Met157 (*gk*) denkbar. Die inhibitorische Aktivität von **47k** an der PfGSK-3 ist somit schlüssig (Abbildung 3-10, Abbildung 3-11).

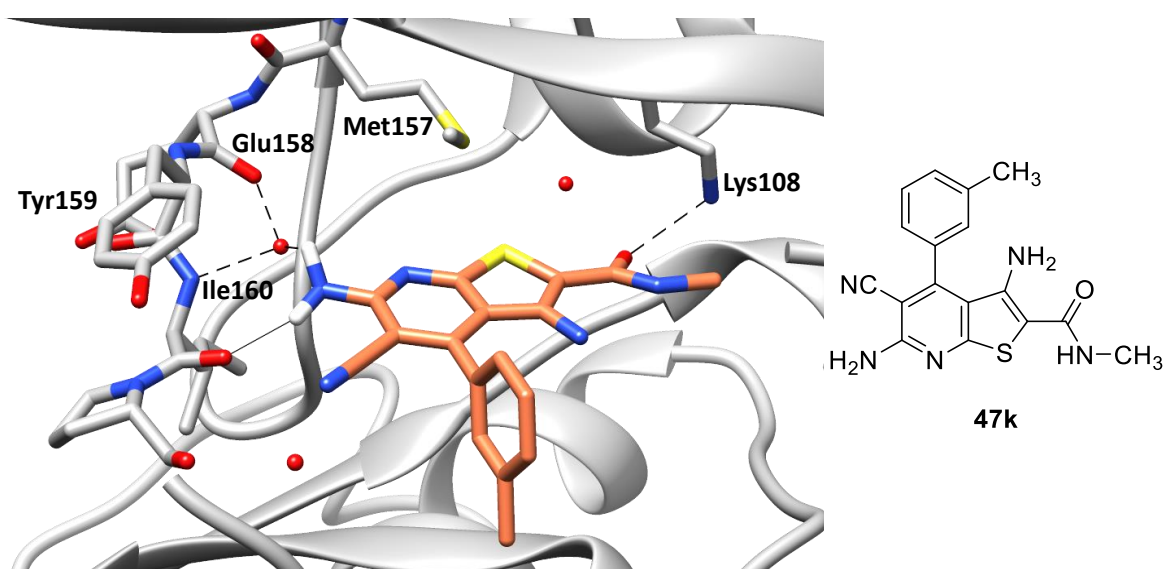


Abbildung 3-10: Durch *docking* mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von **47k** in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3. Die detektierten polaren Wechselwirkungen sind als unterbrochene schwarze Linien dargestellt. Kohlenstoffatome des Liganden sind korallfarben visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb.

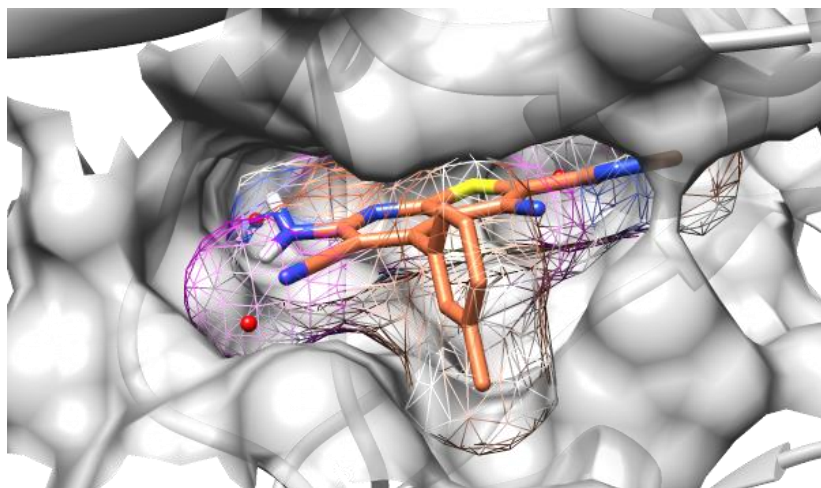
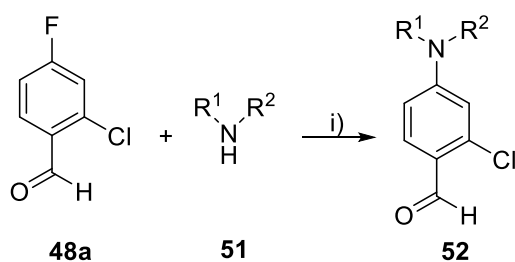


Abbildung 3-11: Durch *docking* mit GOLD erzeugte hypothetische Position von **47k** in der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3*. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind korallfarben visualisiert. Kodierung der Heteroatome: O: Rot; N: Blau; S: Gelb.

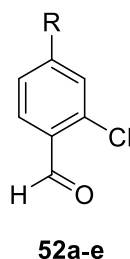
Eine Begründung der fehlenden Inhibition der *PfGSK-3* durch die in dieser Arbeit synthetisierten 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide ist mit den durchgeführten *docking*-Experimenten möglich. Somit ist auf einen neuartigen Wirkmechanismus dieser Stoffklasse zu schließen, der angesichts der hoch antiplasmodialen Aktivität der Verbindungen weiter zu erforschen ist.



Schema 4-2: Synthese der 4-(*N,N*-Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde **52**, nach YONGPRUKSA *et al.*²⁸¹
 Reaktionsbedingungen: i) DMF, K₂CO₃, 100 °C, 5 h – 6.5 h, 82 – 99%.

Die Ausbeuten der 4-(*N,N*-Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde **52a-e** waren sehr gut bis ausgezeichnet (Tabelle 4-1).

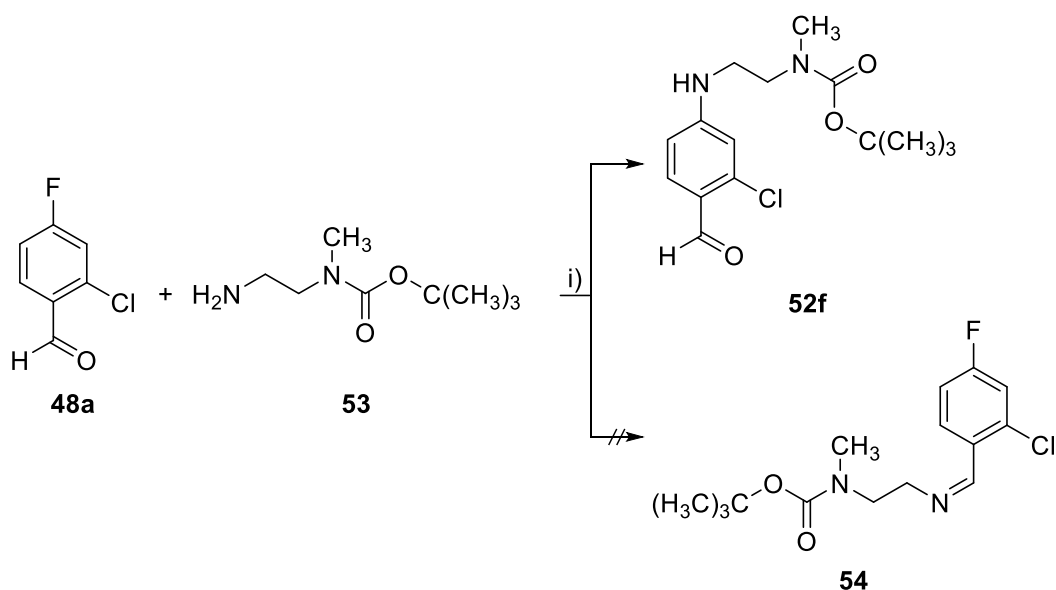
Tabelle 4-1: Synthetisierte 4-(*N,N*-Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde **52a-e**.



Verbindung	R	Ausbeute [%]
52a		82
52b		97
52c		99
52d		82
52e		95

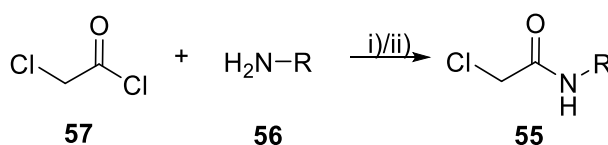
Neben den verwendeten sekundären Aminen sollte auch das primäre Amin **53** zur Derivatisierung von **48a** genutzt werden (Schema 4-3). YONGPRUKSA *et al.* berichten allerdings bei der Umsetzung von **48a** mit primären Aminen wie Benzylamin oder n-Propylamin über die Bildung des Iminderivats **54**.²⁸¹

Unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen konnte in der hier vorgelegten Arbeit erst nach 14 h 30 min eine Produktbildung beobachtet werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **52f** isoliert und identifiziert. Die Bildung des Imin-Derivats **54** wurde nicht beobachtet. Dieses wird jedoch nicht ausgeschlossen. Neben **52f** konnte das Edukt **48a** zurückgewonnen werden. Aufgrund der Ineffizienz der Synthese wurden primäre Amine für die nukleophile Substitutionsreaktion an 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd nicht weiterverfolgt.



Schema 4-3: Reaktion von **48a** und **53**. Dabei konnte **52f** isoliert und identifiziert werden. Die Bildung von **54** wurde nicht beobachtet. Reaktionsbedingungen: i) DMF, K₂CO₃, 100 °C, 14 h 30 min, 3%.

In dem ¹H-NMR-Spektrum von **52f** ist eine Aufspaltung der *tert*-Butylgruppe sowie der Methylgruppe in einem Verhältnis von etwa eins zu zwei sichtbar (Abbildung 4-1, schwarz unterbrochene Rechtecke). Diese Aufspaltung resultiert aus der gehinderten Rotation um die C-N-Bindung der Carbamat-Struktur. Die Signale bei 2.54 ppm und 7.20 ppm sind nicht der Verbindung **52f** zuzuordnen (Abbildung 4-1).



Schema 4-4: Synthese der Acetamid-Derivate **55** nach einer abgewandelten Synthese von CHO *et al.*²⁸²
 Reaktionsbedingungen: i) DCM (anhyd.), K₂CO₃, RT (1 h), Reflux (1 h 10 min); 85 – 100%. Alternativ für **55e**: ii) THF, TEA, 0 °C (1 h), RT (20 h).

Tabelle 4-2: Synthetisierte aliphatische Acetamid-Derivate **55a-e**.

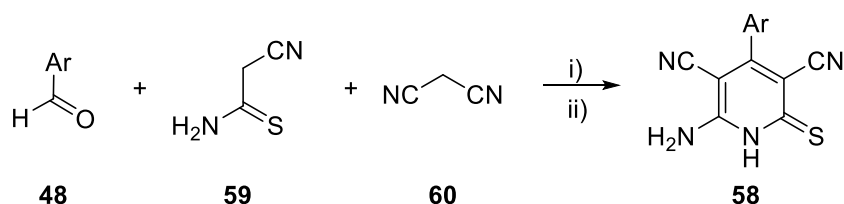
Verbindung	R	Ausbeuten [%]
55a		100
55b		85
55c		100
55d		100
55e		>100 ¹

¹ Wurde nicht in reiner Form isoliert.

4.3 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione

4.3.1 Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione

4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione **58** können in einer Eintopf-Synthese aus dem entsprechenden Aldehyd **48**, 2-Cyanthioacetamid **59** und Malonsäuredinitril **60** nach einer Vorschrift von SHARANIN *et al.*²⁸⁴ synthetisiert werden (Schema 4-5).



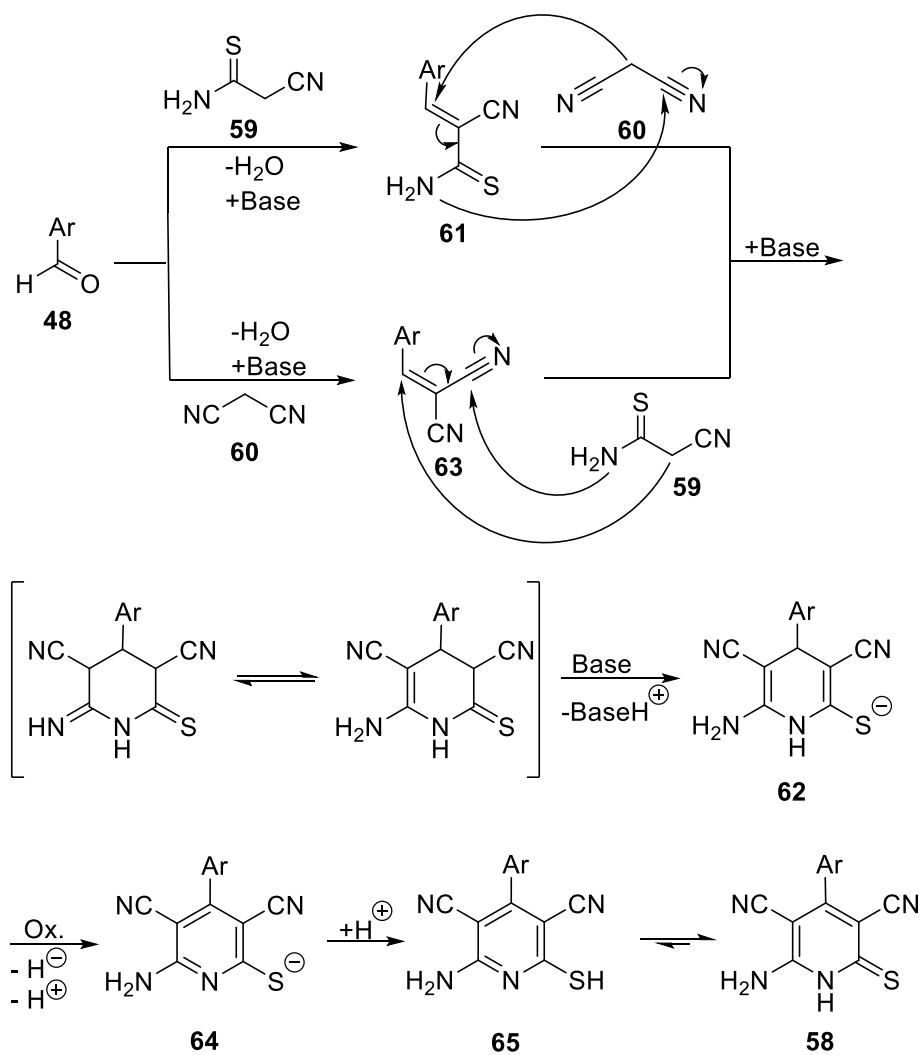
Schema 4-5: Synthese der 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione **58**, nach einer Vorschrift von SHARANIN *et al.*²⁸⁴ Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, *N*-Methylmorpholin, Reflux; ii) Salzsäure.

ZHUANG *et al.* postulieren dabei zweistufige Reaktionsmechanismen.²⁸⁵ Nach einer initialen Knoevenagel-Kondensation des Benzaldehyds **48** mit **59** zum 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid **61** erfolgt die Zyklisierung in Folge einer Michael-Addition mit **60** zum 1,4-Dihydropyridinthiolat **62**. Alternativ kann der Benzaldehyd **48** mit **60** über die Arylidenmalonsäuredinitril-Zwischenstufe **63** und anschließender intramolekularer Zyklisierung mit **59** zu **62** reagieren. Anschließend erfolgt die Oxidation zum Pyridinthiolat **64**. MASCH bestätigt die Entstehung von **64** durch eine Röntgenstrukturanalyse.²³³ Durch Protonierung des Pyridinthiolats wird das gewünschte Thioxo-1,2-dihydropyridin **58** erhalten (Schema 4-6).²⁸⁵

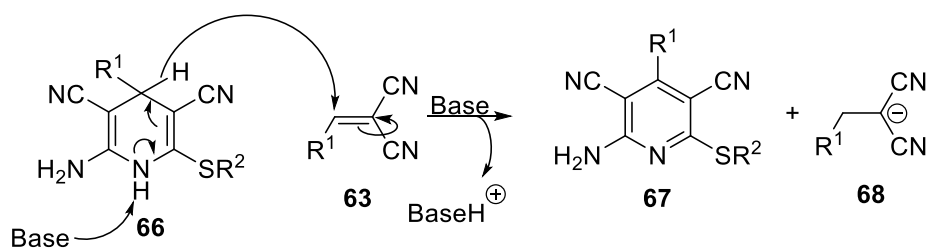
Alternativ hierzu ist die Einbringung des Schwefels durch Thiol-Verbindungen beschrieben.²⁸⁶ Im Folgenden beschriebene literaturbekannte Studien beziehen sich deshalb häufig auf Pyridine, bei denen der Schwefel durch eine Thiol-Verbindung eingebracht wurde. Diese Thioether-Strukturen müssten für die in der vorgelegten Arbeit benötigten Pyridinthione anschließend gespalten werden, weshalb hier die Einbringung des Schwefels durch 2-Cyanthioacetamid realisiert wurde.

EVDOKIMOV *et al.* postulieren die Oxidation des 1,4-Dihydropyridins **66** zum Pyridin **67** unter reduktiven Verbrauch des Knoevenagel-Intermediats **63** (Schema 4-7). Dies begründen sie mit den nie über 50% liegenden Ausbeuten der Pyridine in dieser Eintopf-Synthese sowie fehlender Wasserstoffbildung und der erfolgreichen Reaktion unter Sauerstoffausschluss.²⁸⁷ Nach ZHU *et al.* erfolgt der reduktive Verbrauch über einen langsamen Hydrid-Transfer ausgehend vom C⁴ des Pyridins **66** auf das Knoevenagel-Intermediat **63**. Diesem schließt sich ein schneller basenkatalysierter Protonentransfer ausgehend vom Dihydropyridin-NH an.²⁸⁸ Das Knoevenagel-Intermediat **63** wird somit zu **68** reduziert und steht für die Synthese der Pyridine **67** nicht mehr zur Verfügung.²⁸⁷ Hierdurch sind die geringen Ausbeuten von stets unter 50% zu erklären.

SHESTOPALOV *et al.* konnten das reduzierte 2-Cyan-3-phenylpropanthioamid-Knoevenagel-Intermediat isolieren, welches diese Vermutung stützt.²⁸⁹

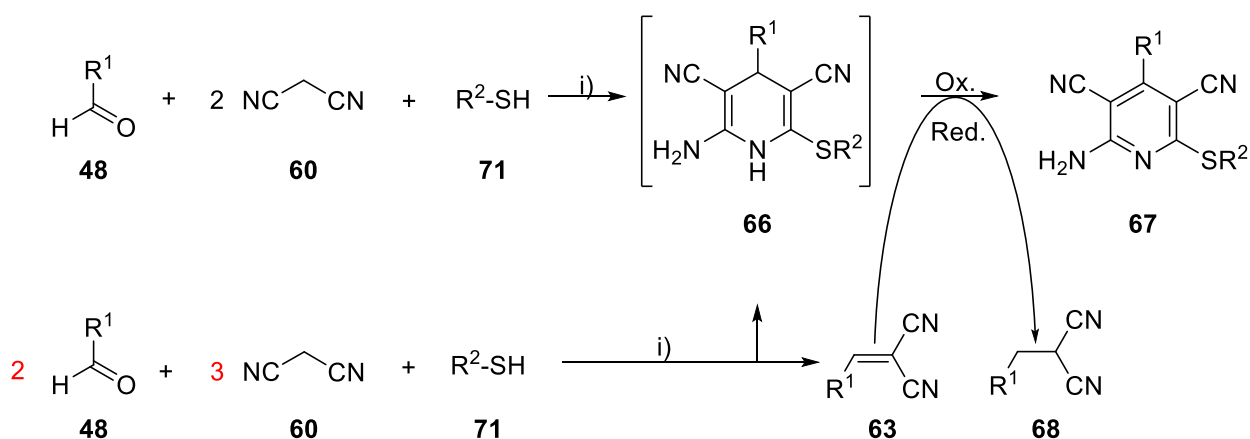


Schema 4-6: Reaktionsmechanismus der Eintopf-Synthese von **58** aus einem aromatischen Aldehyd **48**, 2-Cyanthioacetamid **59** und Malonsäuredinitril **60**, nach ZHUANG *et al.*²⁸⁵, modifiziert nach MASCH²³³.



Schema 4-7: Postulierter reduktiver Verbrauch des Knoevenagel-Intermediats **63** bei der Oxidation von **66** zu **67**, nach EVDOKIMOV *et al.*²⁸⁷

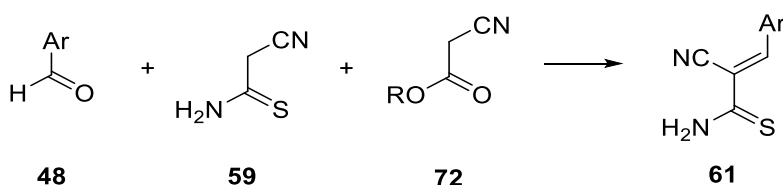
Guo *et al.* haben den Einfluss verschiedener Parameter auf die Ausbeute in der Eintopf-Synthese untersucht. Variiert wurden die Reaktionstemperaturen, die Art und die Stoffmengen der Hilfsbasen sowie die verwendeten Stoffmengenverhältnisse der Edukte (Schema 4-8, 1+2+1 vs. 2+3+1-Ansatz). Beim letztgenannten Ansatz wird zusätzlich ein weiteres Äquivalent des Knoevenagel-Intermediats **63** erzeugt, welches für die Oxidation von **66** zu **67** verbraucht werden kann.²⁹⁰



Schema 4-8: Gewählte Reaktionsbedingungen von Guo *et al.*²⁹⁰ R^1 = Alkyl, Aryl; R^2 = Aryl. Reaktionsbedingungen: Z. B. i) Ethanol, Piperidin.

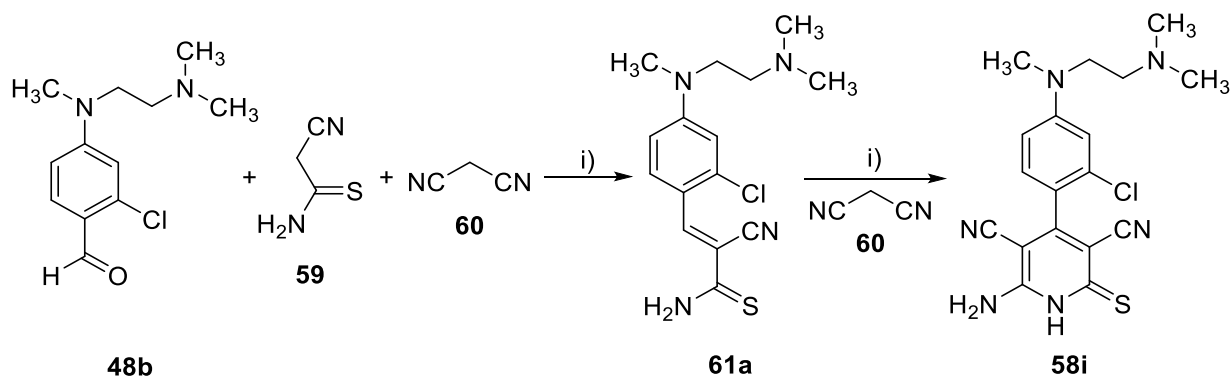
Die Verwendung von Piperidin in Ethanol unter Refluxbedingungen in einem 2+3+1-Ansatz stellte sich den Autoren zufolge als optimal heraus.²⁹⁰ Diese Methodik wurde zusätzlich erfolgreich auf einen Mikrowellenansatz übertragen.²⁹¹ Interessanterweise konnten die Autoren die Ergebnisse nicht auf höher substituierte Edukte übertragen.²⁹¹

Diesbezüglich berichten Dotsenko *et al.* über den Einfluss der Substitution des Benzaldehyds **48** in einer Reaktion mit 2-Cyanthioacetamid **59** und einer CH-aciden Carbonylkomponente **72**.²⁹² Bei Verwendung von Benzaldehyden mit stark elektronenschiebenden Substituenten in der *para*-/ *ortho* Position wird in einem Ansatz mit 2-Cyanthioacetamid **59** und Cyanessigester **72** nur das 3-Aryl-2-cyanprop-2-enthioamid **61** beschrieben (Schema 4-9). Die Autoren schließen daraus, dass Benzaldehyde mit elektronenschiebenden Gruppen in *para*-/ *ortho* Position weniger geeignet für die Hantzsch-Synthese sind.²⁹²



Schema 4-9: Eintopf-Synthese aus Aldehyd **48** mit stark elektronenschiebenden Substituenten, 2-Cyanthioacetamid **59** und Cyanessigester **72** führte zur Bildung von **61**, nach DOTSENKO *et al.*²⁹² R = nicht spezifiziert.

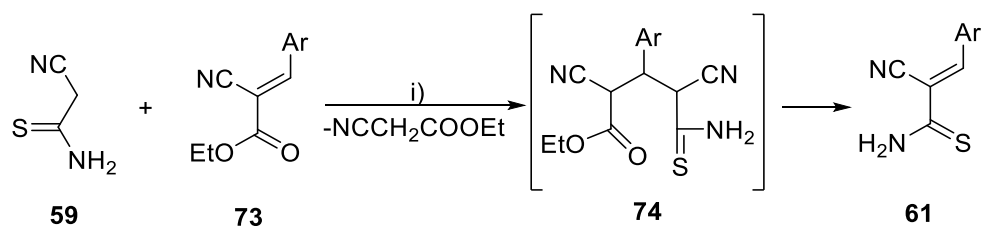
Zusätzlich berichtet MASCH bei der Verwendung von *N', N', N''*-Trimethylethan-1,2-diamin-substituierten Benzaldehyden zur Synthese des entsprechenden Dihydropyridinthions über die Bildung von **61a** anstelle des gewünschten Produkts **58i**. Erst durch einen Überschuss an Malonsäuredinitril **60** beschreibt MASCH die Umsetzung zum gewünschten Thioxo-1,2-dihydropyridin **58i** (Schema 4-10).²³³



Schema 4-10: Reaktionsverlauf bei der Synthese von **58i** aus **48b** mit 2-Cyanthioacetamid **59** und Malonsäuredinitril **60**, nach MASCH.²³³ Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Piperidin, Reflux.

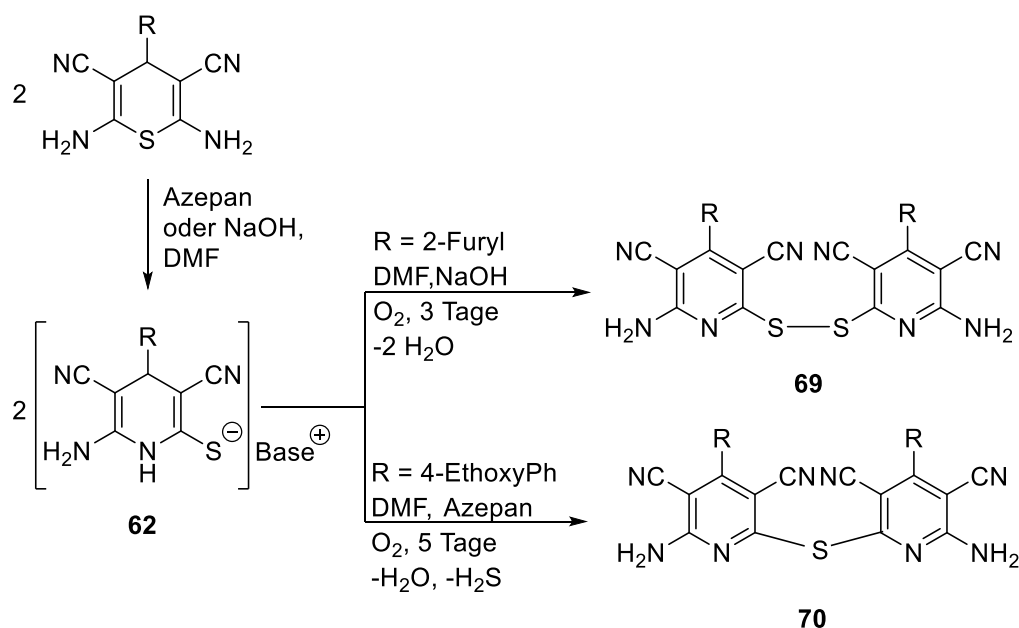
Diese Beobachtungen können durch die elektronenschiebende *N', N', N''*-Trimethylethan-1,2-diamin-Gruppe in *para*-Position des Benzaldehyds erklärt werden.

DYACHENKO *et al.* haben zudem beobachtet, dass Arylmethylencyanessigester **73** und 2-Cyanthioacetamid **59** zur Bildung von **61** führt (Schema 4-11). Diesen Austausch erklären die Autoren ebenfalls durch elektronenschiebende Gruppen am Aromaten, die zur Deaktivierung der Doppelbindung in **73** führen. Hieraus resultiert eine Instabilität und es kommt zum leichten Zerfall von **74**. Infolgedessen wird das weniger nukleophile Anion eliminiert und es bildet sich eine neue C-C-Doppelbindung. Zusätzlich postulieren die Autoren, dass **61** weniger in Ethanol löslich ist als **73**, wodurch nach *Le Chatelier* das Reaktionsgleichgewicht in Richtung **61** verschoben wird.²⁹³



Schema 4-11: Reaktion von **73** mit **59** führt zum Austausch der Komponenten, nach DYACHENKO *et al.*²⁹³
 Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, *N*-Methylmorpholin, 20 °C.

Darüber hinaus berichten DYACHENKO *et al.* über Dimerbildungen von 1,4-Dihydropyridin-Derivaten **62**, welche aus den entsprechenden Thiopyran-Derivaten entstanden sind.²⁹⁴ Dabei wird bei Lagerung von **62** für drei Tage in alkalischer DMF-Lösung die Bildung des Disulfids **69** beschrieben. Bei Lagerung von **62** für fünf Tage in DMF unter Zugabe von Azepan beschreiben die Autoren zusätzlich die Abspaltung von Schwefelwasserstoff bei Ausbildung einer Sulfidbrücke zu **70** (Schema 4-12).²⁹⁴

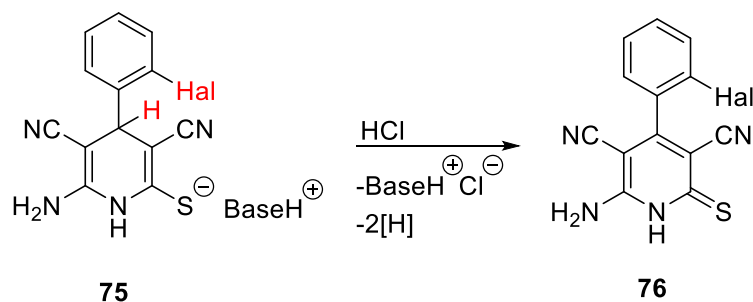


Schema 4-12: Beschriebene Dimerbildungen der 1,4-Dihydropyridinethiolate **62**, nach DYACHENKO *et al.*²⁹⁴

Auch MASCH berichtet über Dimerbildungen von Pyridinthionen. Dabei kommt es zu einem Verlust des Pyridinthion-Monomers während der Reinigungsprozedur.²³³

Zusätzlich berichten SHARANIN *et al.* über eine nicht vollständige Oxidation des 1,4-Dihydropyridins **75**, wenn der Arylsubstituent ein Halogenatom in 2-Position aufweist.

Den Autoren zufolge wird die 1,4-Dihydropyridinform durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Halogen und dem C⁴-H stabilisiert. Erst nach Lösen des Thiolats in Ethanol und Einstellen von pH vier mittels Salzsäure wurde das gewünschte Thioxo-1,2-dihydropyridin **76** erhalten (Schema 4-13).²⁹⁵



Schema 4-13: Oxidation der 1,4-Dihydropyridinform **75** zu **76**. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Halogen in 2-Position und dem C⁴-H stabilisiert im alkalischen Milieu die 1,4-Dihydropyridinform **75**, nach SHARANIN *et al.*²⁹⁵

Auch LITVINOV *et al.* berichten über den Einfluss der Substituenten bei der Synthese von Pyridinen. Elektronenziehende Substituenten in der 5-Position des Pyridins stabilisieren das entstehende Salz **77** (Abbildung 4-2). Bei Anwesenheit von Alkylsubstituenten in der 5- oder 6-Position konnte das entsprechende Salz **77** nicht isoliert werden, da das 1,4-Dihydropyridin zum Pyridin oxidierte. Auch die verwendete Base beeinflusst den Autoren zufolge die Stabilität des Salzes.²⁹⁶

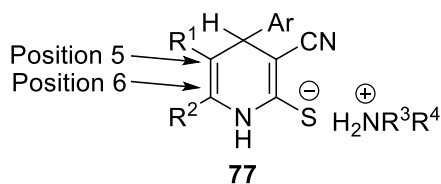
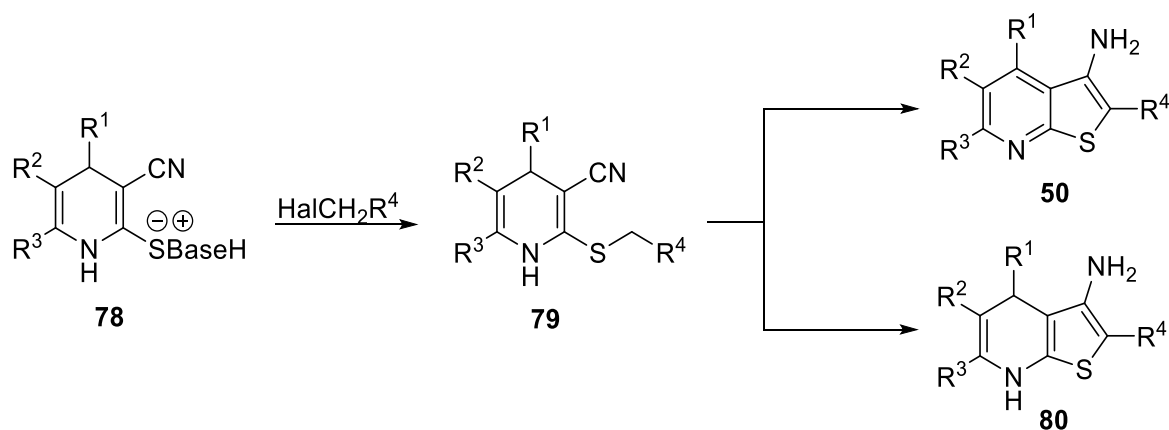


Abbildung 4-2: Einfluss der 5- und 6-Position auf die Stabilität des 1,4-Dihydropyridins **77** gegenüber oxidativen Prozessen, nach LITVINOV *et al.*²⁹⁶ R¹ = H, Carbonyl, Ester; R² = Aryl, Alkyl; R³+R⁴ = Alkyl, (CH₂)₂O(CH₂)₂.

In einer Übersichtarbeit von LITVINOV *et al.* wird allerdings gezeigt, dass **78** nach erfolgter Alkylierung zu **79** vollständig in Folge der Thorpe-Ziegler-Zyklisierung zu **50** oxidiert werden kann (Schema 4-14). Es wird vermutet, dass eine vollständige *in situ* Oxidation zu **50** von der Substitution des Pyridins, dem Lösemittel, der Temperatur, dem Katalysator und dem Alkylierungsreagenz abhängt.²⁹⁷

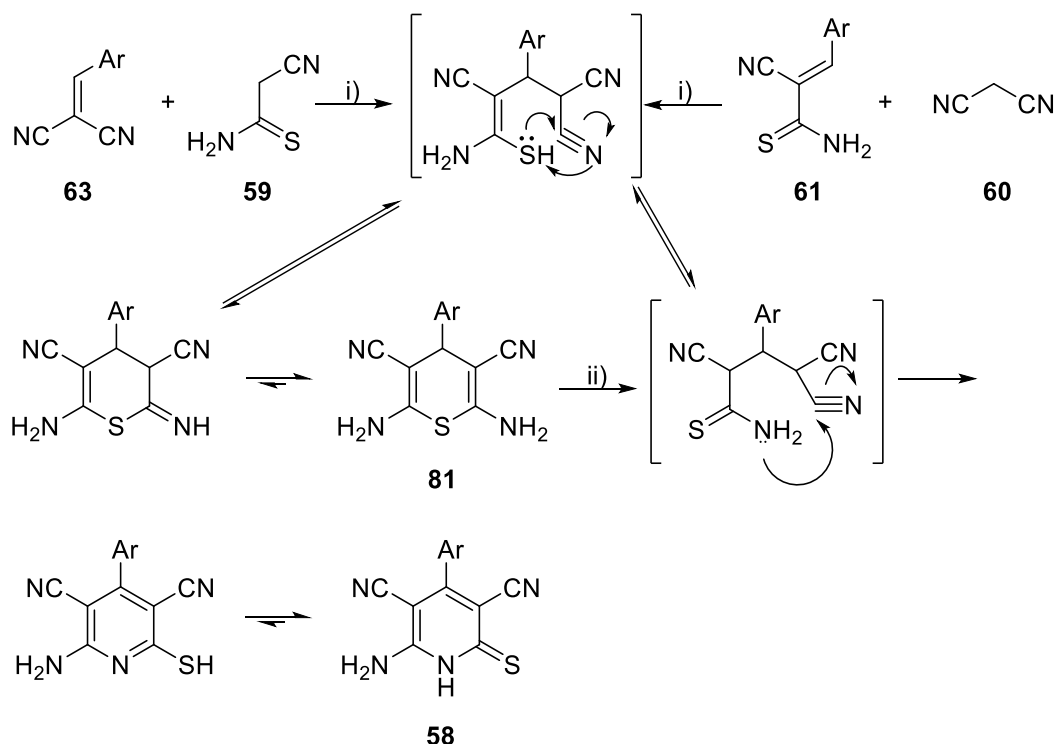


Schema 4-14: Alkylierung von **78** zu **79** und anschließende Thorpe-Ziegler-Zyklisierung. Dabei wird sowohl die Bildung von **50** als auch die Entstehung von **80** beschrieben.²⁹⁷ R^1 = Alkyl, Aryl, Het; R^2 = CONHAr, COOEt, Ac, CN; R^3 = Alkyl, NH_2 ; R^2+R^3 = $\text{COCH}_2\text{CMe}_2\text{CH}_2$; R_4 = CN, COOEt, CONH₂, $\text{C}(\text{NCN})\text{NH}_2$, COAr, CONHAr.

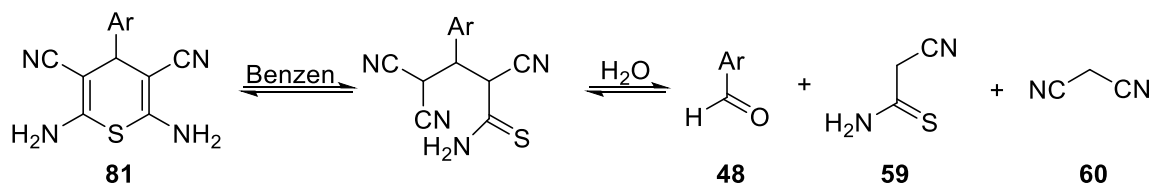
DYACHENKO *et al.* beobachteten die Bildung von **50** aus **79** bei Verwendung von DMF und wässriger KOH-Lösung.²⁹⁸

Des Weiteren berichten SHARANIN *et al.* von der Entstehung von Thiopyranen **81** durch eine Reaktion aus Arylidenmalonsäuredinitril **63** und **59** bzw. aus dem 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid **61** und **60** bei Raumtemperatur. Die Thiopyrane **81** entstehen kinetisch kontrolliert und ihre Bildung ist reversibel.^{299,300} Das Gleichgewicht ist dabei vollständig in Richtung der Amino-Form **81** verschoben (Schema 4-15). Unter Refluxbedingungen rezyklierten sie in die thermodynamisch stabileren Pyridine **58**.²⁹⁹

SHARANIN und SHESTOPALOV spekulieren außerdem, dass sich **81** unter Ringöffnung erneut zum Michael-Addukt und bei Anwesenheit von Wasser zu **48**, **59** und **60** zersetzt (Schema 4-16). Diese können schließlich erneut reagieren und unter Refluxbedingungen das Pyridinthion bilden.³⁰¹



Schema 4-15: Rezyklisierung von Thiopyranen **81** zu **58** unter Einwirkung von Wärme, nach SHARANIN *et al.*^{299,300} Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Piperidin, RT; ii) Ethanol, Piperidin, Reflux.



Schema 4-16: Postulierte Ringöffnung von **81** und Bildung der Edukte bei Anwesenheit von Wasser, nach SHARANIN *et al.*³⁰¹

Die Bildung von Pyridinthionen bereits bei Raumtemperatur aus Formaldehyd und zwei Äquivalenten Cyanthioacetamid³⁰² sowie aus 2,6-Dichlorbenzaldehyd, Malonsäuredinitril und Thiophenol wurde allerdings auch beschrieben.³⁰³

4.3.2 Synthese neuer 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione

Unter Berücksichtigung der von anderen Arbeitsgruppen publizierten Erkenntnisse wurde die konventionelle Eintopf-Synthese beispielhaft mit einem Ansatz aus 3-Methoxybenzaldehyd **48c**, 2-Cyanthioacetamid **59** und Malonsäuredinitril **60** untersucht. Der 2+3+1-Ansatz nach Guo *et al.*²⁹⁰ (Schema 4-8), der hinsichtlich einer Ausbeuteerhöhung am erfolgversprechendsten schien, wurde mit dem konventionellen Ansatz sowie mit den mikrowellengestützten Synthesen²⁹¹ verglichen.

Dabei wurden Reaktionszeiten, Temperaturen sowie die Ansatzmenge und das Eduktverhältnis modifiziert (Tabelle 4-3).

Der unter Reflux-Bedingungen durchgeführte 2+3+1-Ansatz stellte sich dabei als unterlegen heraus. Aus dem konventionellen 1+1+1-Ansatz unter Reflux-Bedingungen wurde neben dem gewünschten Produkt **58a** zu annähernd gleichen Anteilen das kinetisch kontrollierte Thiopyran **81a** als Nebenprodukt gewonnen, welches sich offensichtlich auch unter Reflux-Bedingungen ausbilden kann (Schema 4-3). Die Erhöhung des Knoevenagel-Intermediats nach GUO *et al.*^{290,291} stellt somit keine generelle Lösung zur Erhöhung der Pyridinthion-Ausbeute dar. In Mikrowellen-gestützten Synthesen wurde durch Verlängerung der Reaktionszeiten und/oder Erhöhung der Temperatur in dem 1+1+1-Ansatz die Bildung von **81a** reduziert und die Ausbeute des thermodynamisch kontrollierten Produkts **58a** gesteigert. Die Mikrowellen-gestützten 2+3+1-Ansätze stellten sich ebenfalls als nicht optimal heraus. Durch einen 1+1+1-Mikrowellenansatz bei 300 Watt, 30 min und 100 °C wurde mit 82% die höchste Ausbeute von **58a** erzielt. (Tabelle 4-3). Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht direkt auf einen größeren Ansatz übertragen werden. Schlussfolgernd müssen je nach den Substituenten des aromatischen Aldehyds, der Größe des Reaktionsansatzes und der Bildung der entsprechenden Nebenprodukte die Synthesebedingungen optimiert werden.

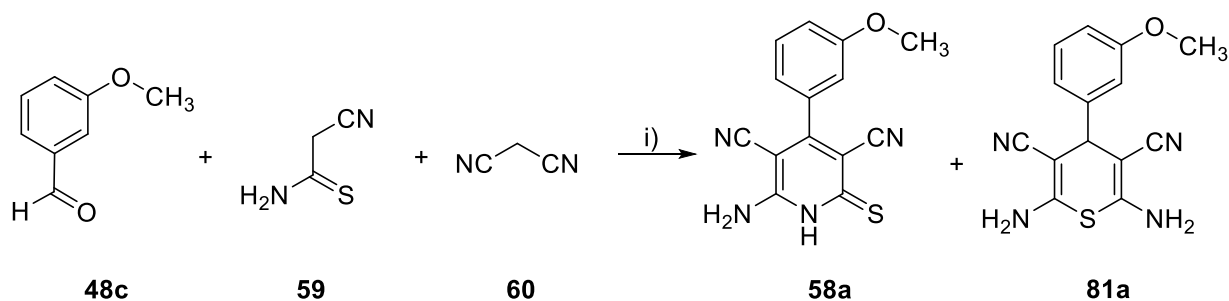


Abbildung 4-3: Eintopf-Synthese aus **48c**, **59** und **60**. Neben dem gewünschten Produkt **58a** konnte das Thiopyran-Derivat **81a** isoliert und identifiziert werden. Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Piperidin, Reflux, 3 h 10 min, Ausbeute **58a**: 30%, Ausbeute **81a**: 29%.

Tabelle 4-3: Durchgeführte Synthesen zur Optimierung der Pyridinthion-Ausbeute nach Guo *et al.*²⁹⁰ und auf Grundlage des detektierten Nebenprodukts. **A** stellt den Pyridinthion-Anteil **58a** im Rohprodukt dar; **B** ist der Anteil des Thiopyrans **81a**. **C** sind weitere nicht identifizierte Nebenprodukte. Die Anteile der Verbindungen im Rohprodukt wurden mittels HPLC-Analyse (100%-Methode) ermittelt.

Ansatz	Methode	Reaktions- zeit [min]	Tempe- ratur [°C]	Anteil des Rohprodukts (AUC) A [%]	Anteil des Rohprodukts (AUC) B [%]	Anteil C (AUC) [%]	Ausbeute Rohprodukt [%]
1:1:1	Reflux ²	200	-	47	42	11	32 ⁶
	Reflux ²	540	-	– ⁴	– ⁴	100	– ⁴
	MW ^{1,3}	10	90	11	69	20	89
	MW ^{1,3}	30	90	75	12	13	82
	MW ^{2,3}	30	100	65	15	20	>100
	MW ^{1,3}	30	100	82	8	10	90
	MW ^{1,3}	30	110	81	1	18	95
	MW ^{1,3}	45	90	77	8	15	81
2:3:1	Reflux ²	200	-	12	62	26	>100 ⁵
	MW ^{1,3}	10	90	10	83	7	>100
	MW ^{1,3}	30	90	55	22	23	>100
	MW ^{1,3}	45	90	43	41	16	>100

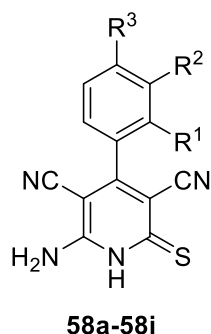
¹ Ansatzgröße: 0.3 mmol. ² Ansatzgröße: 2.5 mmol. ³ MW: Mikrowellensynthese bei 300 Watt.

⁴ Zersetzung. ⁵ Nach Flüssig-Flüssig-Extraktion. ⁶ Nach SC-Aufreinigung; Produkt enthielt noch geringe Mengen des Dimers von **58a**.

Die in der vorgelegten Arbeit synthetisierten 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione **58** wurden folglich vereinfacht in der konventionellen Eintopf-Synthese nach einer modifizierten Vorschrift von SHARANIN *et al.*²⁸⁴ synthetisiert (Schema 4-5).

Dabei wurde der entsprechende Aldehyd **48**, 2-Cyanthioacetamid **59** und Malonsäuredinitril **60** in Ethanol unter basischen Bedingungen refluxiert. Als Base wurde Piperidin verwendet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und nach FUGEL¹⁷⁴ das erhaltene Öl mit Wasser, Essigsäure und Dichlormethan versetzt, wobei an der Phasengrenzfläche das Thioxo-1,2-dihydropyridin **58** ausfiel. Wenn kein Niederschlag entstand, wurde das Produkt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion erhalten.

Auf diese Weise konnten die in Tabelle 4-4 genannten Pyridinthione **58** synthetisiert werden.

Tabelle 4-4: Mittels Eintopf-Synthese dargestellte Thioxo-1,2-dihydropyridine **58a-58i**.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³
58a	H	Methoxy-	H
58b	H	Cl	H
58c	H	F	H
58d	H	Methyl-	H
58e	Cl	H	
58f	Cl	H	
58g	Cl	H	
58h	Cl	H	
58i	Cl	H	

4.3.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thionen

4.3.3.1 Röntgenkristallstrukturanalyse des Thiopyran-Nebenprodukts

Das in Abschnitt 4.3.2 erwähnte isolierte Nebenprodukt aus dem konventionellen Ansatz stellt das kinetisch kontrollierte Thiopyran-Derivat **81a** dar. Die Identität konnte mit einer Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt werden (Abbildung 4-4). Abbildung 4-4|A zeigt die Anordnung zweier Thiopyranmoleküle unter Ausbildung von N-H---N-Wasserstoffbrückenbindungen. Die Verbindung liegt in einer Boot-Konformation mit S1 und C4 als Bug- und Heckpositionen vor.

Die N-H---N Wasserstoffbrückenbindungen führen im Kristallgitter zu einer wellenförmigen Anordnung in Schichten (Abbildung 4-4|B).

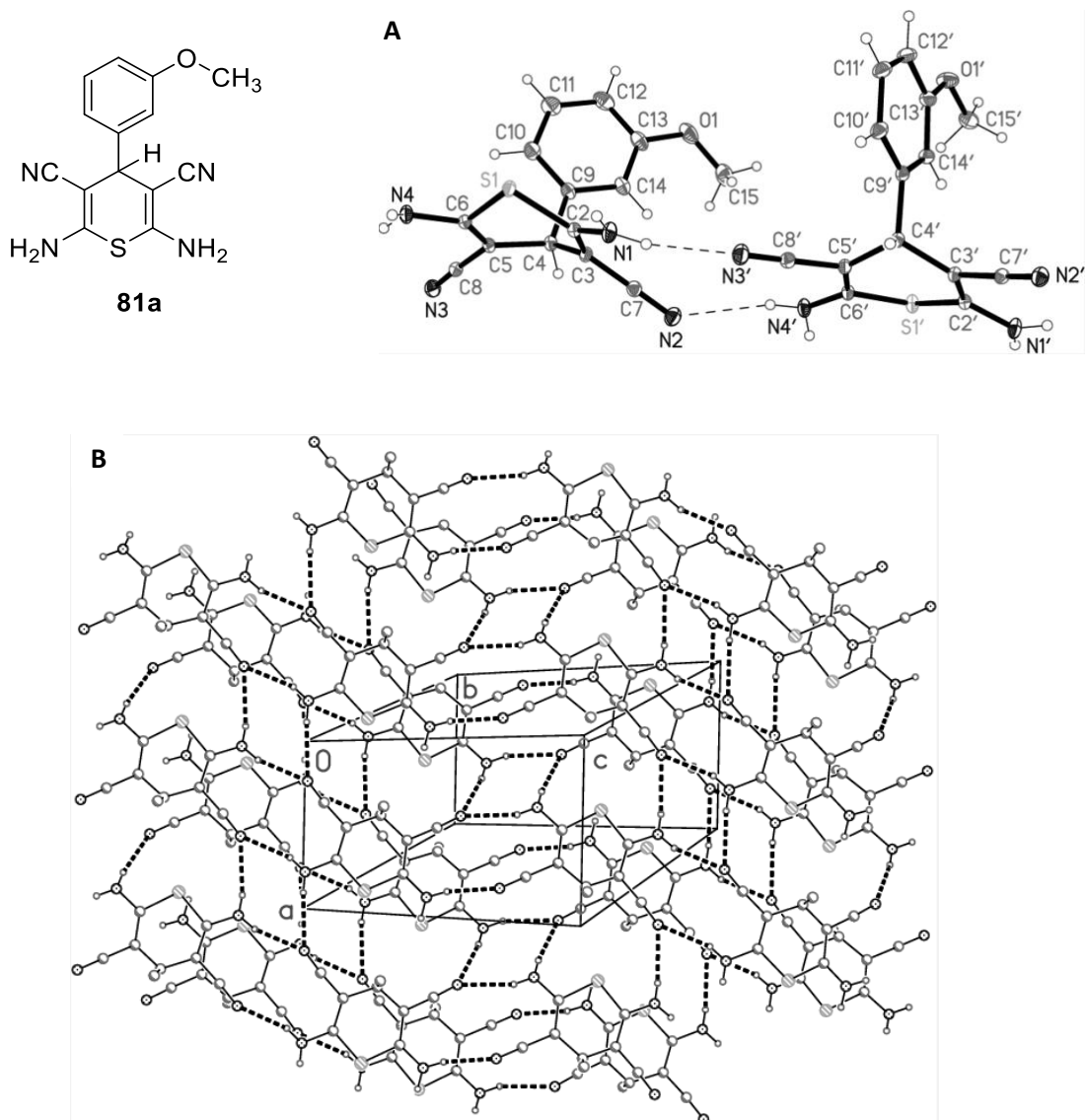
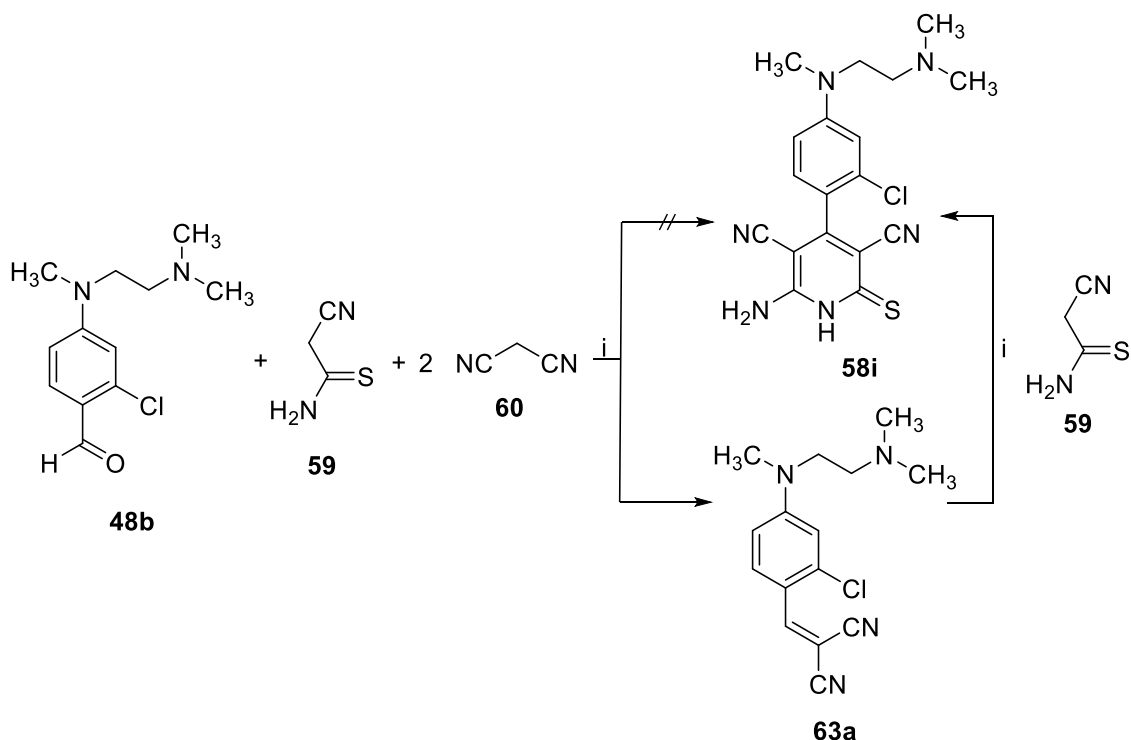


Abbildung 4-4: Röntgenkristallanalyse des detektierten Nebenprodukts **81a**. A: Boot-Konformation der zwei Thiopyran-Derivate **81a**. B: Wellenförmige Anordnung mehrerer Thiopyran-Moleküle in Schichten.

4.3.3.2 Verwendung *N'*, *N'*, *N''*-Trimethylethan-1,2-diamin-substituierter Benzaldehyde in der Eintopf-Synthese

Aufgrund der von MASCH²³³ berichteten nicht vollständigen Umsetzung *N'*, *N'*, *N''*-Trimethylethan-1,2-diamin-substituierter Benzaldehyde in der Eintopf-Synthese (Abschnitt 4.3.1), wurde in der vorgelegten Arbeit bei Verwendung der so substituierten Benzaldehyde anfangs ein Ansatz mit einem Äquivalent des Benzaldehyds **48b**, einem Äquivalent 2-Cyanthioacetamid **59** und zwei Äquivalenten Malonsäuredinitril **60** untersucht (Schema 4-17).

Dabei wurde jedoch das Arylidenmalonsäure-Derivat **63a** identifiziert. Nach Zugabe eines weiteren Äquivalents **59** konnte **58i** zwar detektiert, jedoch nicht isoliert werden.



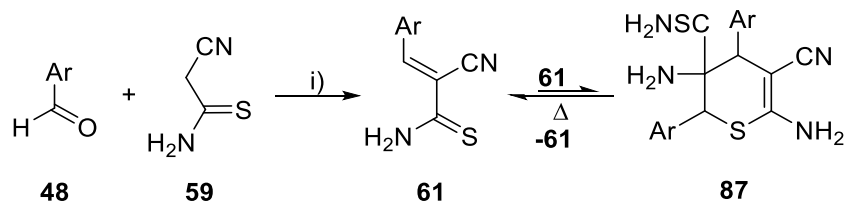
Schema 4-17: Versuch zur Darstellung von **58i**. Dabei bildete sich **63a**. Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Piperidin, Reflux, 4 h.

In einem äquimolaren Ansatz aus **48b**, **59** und **60** wurde **58i** erhalten. Die Umwandlung von **48b** zu **58i** ist dementsprechend entgegen der von MASCH²³³ beschriebenen Beobachtungen auch unter den Bedingungen der Eintopf-Synthese möglich.

4.4 Synthese von Pyridinthion-Derivaten ausgehend von 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamiden

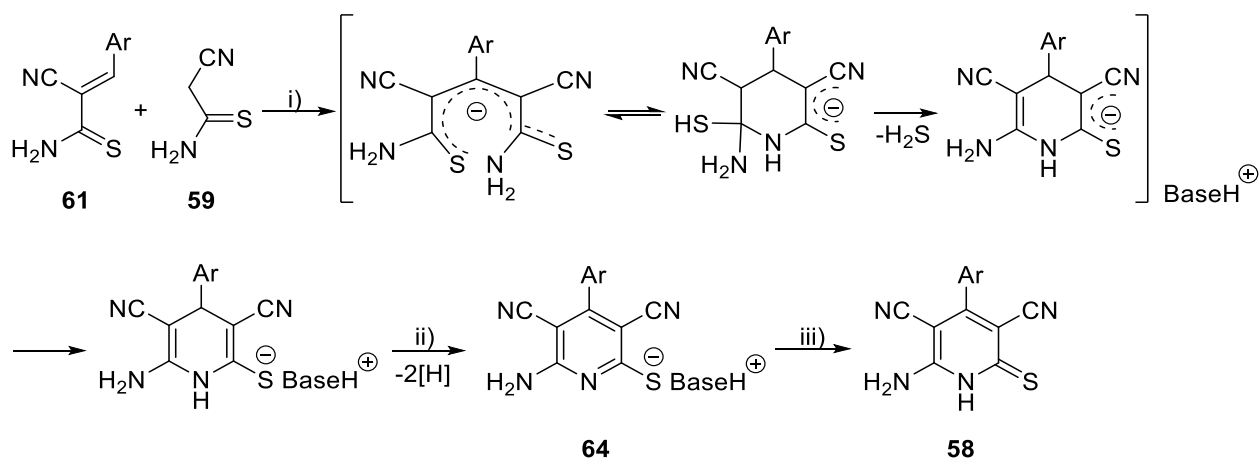
4.4.1 Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide

3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61** können nach einer Vorschrift von BRUNSKILL *et al.* synthetisiert werden. Der entsprechende Benzaldehyd **48** und 2-Cyanthioacetamid **59** reagieren dabei unter Verwendung von Triethylamin als Base in einer Knoevenagel-Reaktion miteinander (Schema 4-20).³⁰⁴ Die Autoren beobachteten eine temperaturabhängige Dimerisierung in Folge einer Mono-Diels-Alder-Reaktion zum 3,4-Dihydro-2*H*-thiopyran **87** (Schema 4-20). Bei erhöhter Temperatur liegt den Autoren zu Folge das Gleichgewicht auf der Seite des Monomers.³⁰⁴



Schema 4-18: Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61** aus **48** und **59** sowie die beschriebene temperaturabhängige Dimerisierungsreaktion zu **87**, nach BRUNSKILL *et al.*³⁰⁴ Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Triethylamin, 50 °C.

Darüber hinaus beschreiben SHARANIN *et al.* bei der Reaktion von 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid (**61**) mit 2-Cyanthioacetamid **59** die Entstehung des Pyridinthiolats **64**. Dieses entsteht nach einer initialen Michael-Addition und anschließender intramolekularer Zyklisierung. Nach Zugabe von Salzsäure wurde das Pyridinthion **58** erhalten (Schema 4-19).²⁹⁵

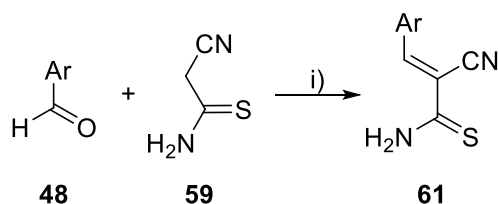


Schema 4-19: Postulierter Reaktionsmechanismus aus **61** und **59** zum Pyridinthion **58**, nach SHARANIN *et al.*²⁹⁵ Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, *N*-Methylmorpholin, 25 °C; ii) Ethanol, *N*-Methylmorpholin, Reflux; iii) Ethanol, Salzsäure.

Auch DYACHENKO *et al.* berichten von der Bildung des Pyridinthions **58** bei Verwendung eines Benzaldehyds mit doppelt äquimolaren Mengen an 2-Cyanthioacetamid **59** mit einer Ausbeute von 73%.³⁰⁵

4.4.2 Synthese neuer 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide

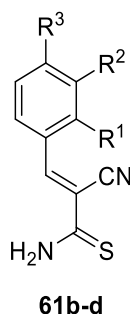
In der vorgelegten Arbeit wurden die 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61** nach der Vorschrift von BRUNSKILL *et al.* synthetisiert (Schema 4-20).³⁰⁴ Die von den Autoren beschriebene Dimerisierung wurde nicht beobachtet.



Schema 4-20: Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61** aus **48** und **59**, nach BRUNSKILL *et al.*³⁰⁴
 Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Triethylamin, 50 °C, 10 min – 1 h, 33 – 99%.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 4-5 genannten 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61b-61d** dargestellt.

Tabelle 4-5: Synthetisierte 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide **61b-61d**.

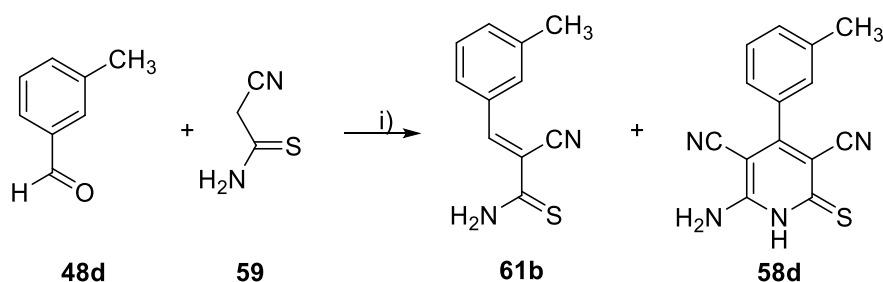


Verbindung	R ¹	R ²	R ³	Ausbeute
61b	H	Me	H	– ^a
61c	H	H	H	33%
61d	Cl	H	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	99%

^a Wurde trotz säulenchromatographischer Aufreinigung nicht in reiner Form isoliert.

4.4.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamiden

In der vorgelegten Arbeit wurden bei unsubstituierten Benzaldehyden oder bei Benzaldehyden mit einem *meta*-Methyl-Substituenten deutlich geringere Ausbeuten erzielt als bei Benzaldehyden mit einem *N*-Boc-Piperazin-Substituenten (Tabelle 4-5). Außerdem wurde in einem Ansatz aus 3-Methylbenzaldehyd **48d** und 2-Cyanthioacetamid **59** neben dem 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid-Derivat **61b** das entsprechende Pyridinthion-Derivat **58d** isoliert (Schema 4-21).



Schema 4-21: Synthese von **61b** aus **48d** und **59** und dabei isoliertes Nebenprodukt **58d**. Reaktionsbedingungen: i) Ethanol, Triethylamin, 50 °C, 1 h.

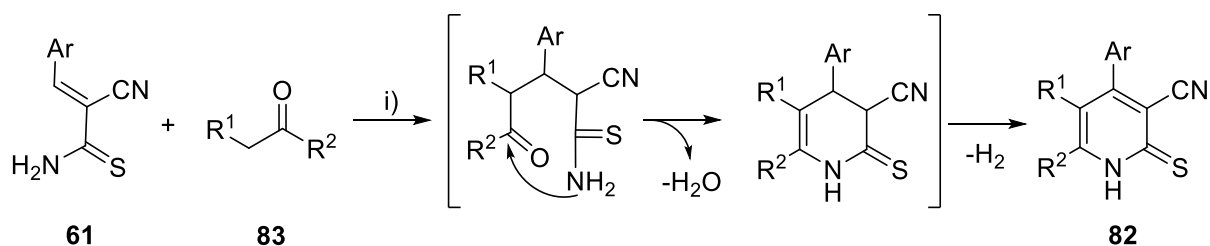
Auch die von YADAV *et al.*³⁰⁶ beschriebenen Synthesebedingungen führten nicht zu einer Ausbeutesteigerung von **61b**. Darüber hinaus wurde durch eine abgewandelte Methode nach BRUNSKILL *et al.*³⁰⁴ **58d** als Hauptprodukt erhalten. Hierzu wurde 3-Methylbenzaldehyd **48d** und 2-Cyanthioacetamid **59** in getrocknetem Toluol mit Triethylamin unter Wasserabscheidung mittels Molekularsieb bei 50 °C angesetzt.

Die in der vorgelegten Arbeit verwendeten Reaktionsbedingungen scheinen demzufolge die Bildung des Pyridinthions **58d** bei der Umsetzung von 3-Methylbenzaldehyd und 2-Cyanthioacetamid zu ermöglichen. Ein direkter Vergleich der Ausbeuten ist aufgrund der nicht erfolgreich durchgeführten säulenchromatographischen Aufreinigungen nicht möglich. Das 2-Cyanthioacetamid **59** wird durch Inkorporation in **58d** der Synthese des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamids **61** entzogen, wodurch die Ausbeute verringert wird. Dieser Reaktionsansatz stellt dementsprechend vielmehr eine mögliche Alternative zu der unter Kapitel 4.3.2 beschriebenen Eintopf-Synthese für Pyridinthion-Derivate dar.

4.4.4 Synthese neuer Pyridinthion-Derivate ausgehend von **61**

Die Synthese der Pyridinthion-Derivate **82** ausgehend von den 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamiden **61** mit einer Carbonyl-Komponente **83** wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von ELNAGDI *et al.* in 1,4-Dioxan durchgeführt.³⁰⁷ Alternativ ist diese Synthese ebenfalls in Ethanol für heterozyklische Ketone beschrieben.³⁰⁸

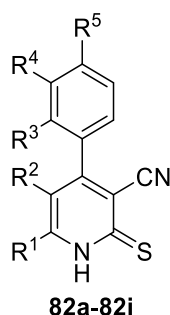
Die Autoren postulieren dabei eine Michael-Addition von **83** an die Doppelbindung des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamids **61** zum Michael-Addukt-Intermediat. Durch nukleophilen Angriff des Stickstoffs an der Carbonylfunktion erfolgt eine intramolekulare Zyklisierung. Unter den Reaktionsbedingungen findet schließlich eine Oxidation zum Pyridinthion **82** statt (Schema 4-22). Eine Zyklisierung durch Angriff des Schwefels an der Carbonylfunktion wurde nicht beschrieben. Die Autoren schließen eine intermediäre Bildung jedoch nicht aus.³⁰⁷



Schema 4-22: Reaktionsabfolge des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamids **61** mit **83**, modifiziert nach ELNAGDI *et al.*³⁰⁷ Reaktionsbedingungen: i) 1,4-Dioxan, Piperidin, 80 °C, 1 h – 4 h, 21 – 55%.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 4-6 genannten Pyridinthion-Derivate **82a-82i** synthetisiert.

Tabelle 4-6: Synthetisierte Pyridinthion-Derivate **82a-82i**.



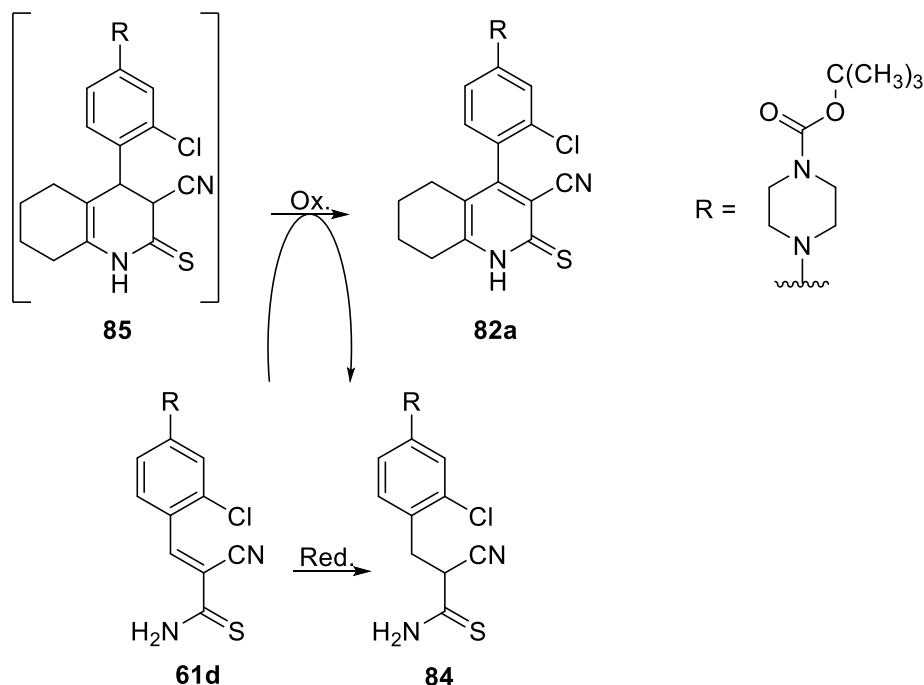
Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
82a	-(CH ₂) ₄ -		Cl	H	<i>N</i> -Boc-Piperazino-
82b	-(CH ₂) ₃ -		Cl	H	<i>N</i> -Boc-Piperazino-
82c	CH ₃	H	Cl	H	<i>N</i> -Boc-Piperazino-
82d	-(CH ₂) ₃ -		H	H	H
82e	-(CH ₂) ₄ -		H	H	H
82f	-(CH ₂) ₄ -		H	CH ₃	H
82g	-(CH ₂) ₃ -		H	CH ₃	H
82h	CH ₃	(H ₃ C) ₃ COOC-	H	H	H
82i	CH ₃	(H ₃ C) ₃ COOC-	H	CH ₃	H

4.4.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten sowie analytische Besonderheiten bei der Synthese von Pyridinthion-Derivaten ausgehend von **61**

4.4.5.1 Isolierung des reduzierten Knoevenagel-Intermediats

Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung von **82a** wurde ein Nebenprodukt isoliert, welches mittels 2D-NMR-Analysen identifiziert wurde. Dabei handelt es sich um das reduzierte Knoevenagel-Intermediat **84**.

Bei der Oxidation des anellierten Tetrahydropyridins **85** zum Pyridinthion **82a** wird **61d** zu **84** reduktiv verbraucht (Schema 4-23). Hiermit kann die geringe Ausbeute der synthetisierten Pyridinthione **82** erklärt werden.



Schema 4-23: Oxidation von **85** zu **82a** unter reduktivem Verbrauch des Knoevenagel-Intermediats **61d** zu **84**.

Im Ausschnitt des ¹H, ¹H-COSY-NMR-Spektrums von **84** (Abbildung 4-5) sind drei Signale für jeweils ein Proton erkennbar. Alle drei Signale zeigen ein Aufspaltungsmuster eines Dubletts von Dubletts. Sowohl die Aufspaltung in drei Signale als auch ihr Aufspaltungsmuster ist auf das neu entstandene Stereozentrum (gekennzeichnet durch * in der Verbindung) zurückzuführen. Hierdurch werden die Protonen der Methylengruppe diastereotop und koppeln untereinander. Durch die Kreuzpeaks (schwarz unterbrochene Ellipsen) wird die Kopplung der Protonen untereinander belegt. Sowohl das ¹H-NMR-Spektrum als auch das ¹³C-NMR-Spektrum (nicht abgebildet) bestätigen die Identität dieser Verbindung.

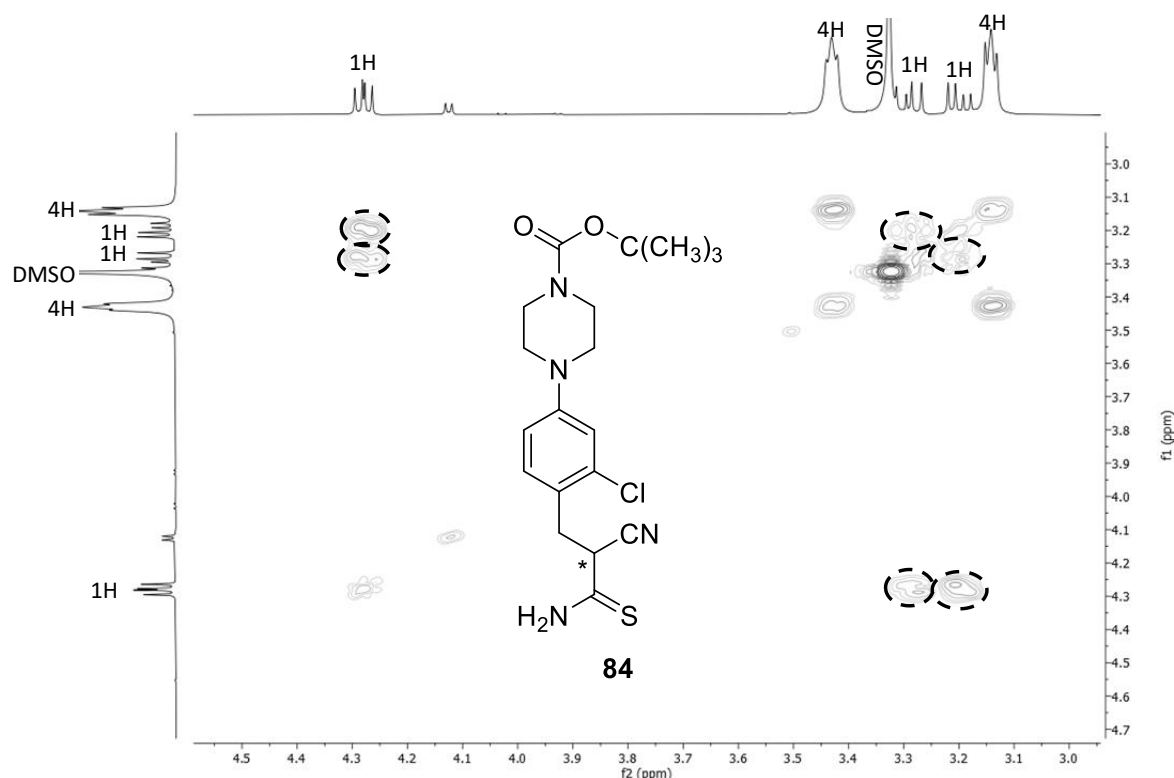
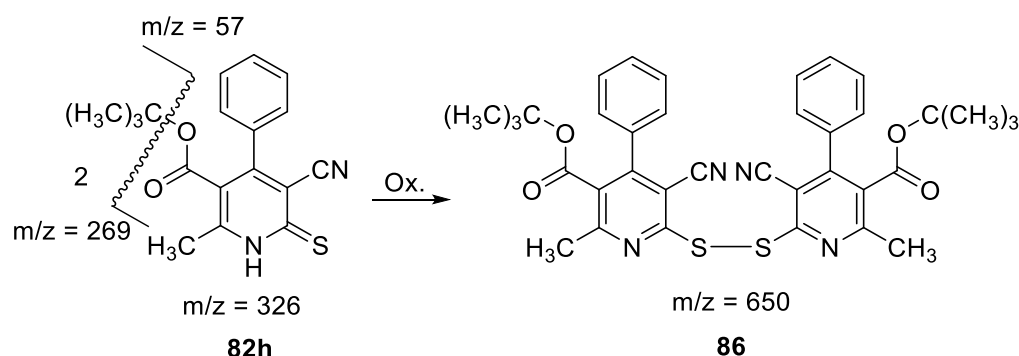


Abbildung 4-5: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von **84**. Die schwarz unterbrochenen Ellipsen stellen Kreuzpeaks dar, die die Kopplung der diastereotopen Methylengruppe untereinander und mit dem Proton im Stereozentrum (*) beweisen. Das Signal bei 4.13 ppm ist einer Verunreinigung zuzuordnen.

4.4.5.2 Massenspektrometrische Detektion des Dimers

Beispielhaft wurde nach der durchgeführten säulenchromatographischen Aufreinigung von **82h** das oxidativ gebildete Dimer **86** massenspektrometrisch identifiziert (Schema 4-24). Die $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Massen können im entsprechenden Massenspektrum dem Monomer **82h** bzw. dem Dimer **86** zugeordnet werden (Abbildung 4-6). Der Basispeak im Spektrum von **82h** bei $m/z = 270.7$ kann durch Abspaltung der *tert*-Butylgruppe erklärt werden (Abbildung 4-6|A, schwarzer Pfeil). Die detektierte $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Masse mit $m/z = 683$ (Abbildung 4-6|B, schwarzer Pfeil) kann durch ein Methanol-**86**-Addukt erklärt werden. Methanol hat ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 32$.



Schema 4-24: Oxidation von zwei Molekülen **82h** zu dem Dimer **86**.

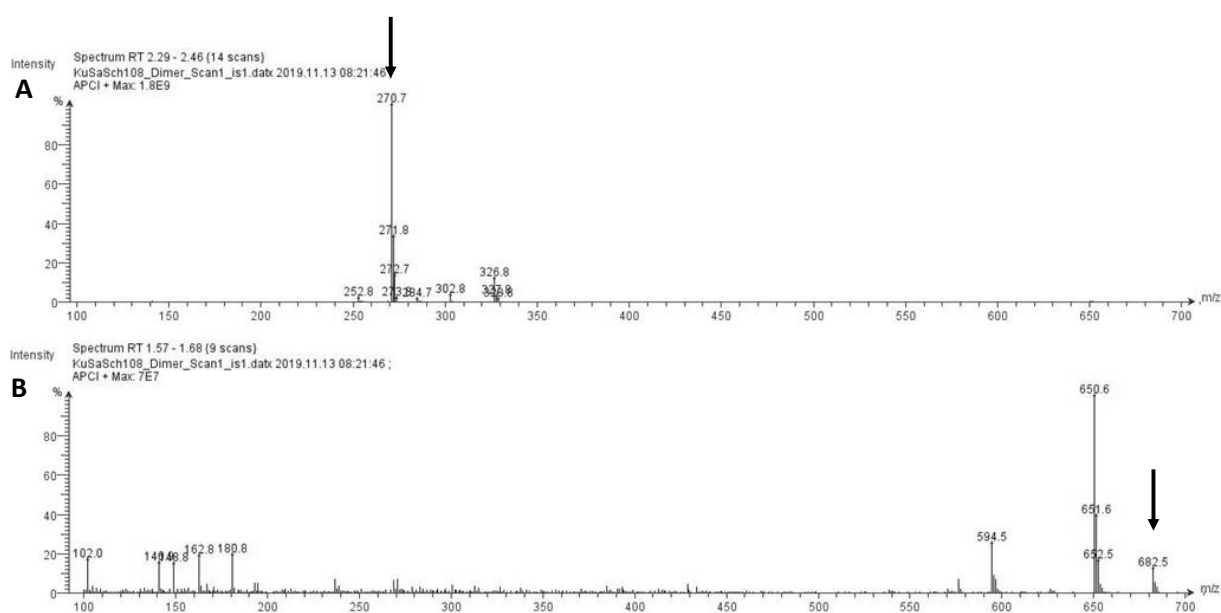


Abbildung 4-6: Massenspektrum (APCI pos., TLC) von **82h** (A) und **86** (B). A: Der schwarze Pfeil zeigt den Basispeak der Verbindung **82h**, der durch die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe erklärt werden kann. B: Der schwarze Pfeil zeigt die detektierte $[M+H]^+$ -Masse von $m/z = 683$, welche durch ein Methanol-**86**-Addukt erklärt werden kann.

4.4.5.3 Bestätigung der Struktur des Pyridinthions mittels ^{13}C -NMR-Analyse

Das Vorliegen der Pyridinthion-Form anstelle der entsprechenden Thiol-Form kann mit Hilfe der chemischen Verschiebung des Signals für das Kohlenstoffatom in 2-Position bestätigt werden. Beispielhaft ist in Abbildung 4-7 das ^{13}C -NMR-Spektrum von **82d** abgebildet. Dabei befindet sich das Signal des Kohlenstoffatoms in 2-Position bei einer chemischen Verschiebung von etwa $\delta = 176$ ppm (Abbildung 4-7, schwarzer Pfeil). Die chemische Verschiebung des entsprechenden Kohlenstoffatom-Signals der Pyridinthiol-Form liegt bei etwa $\delta = 160$ ppm.³⁰⁹

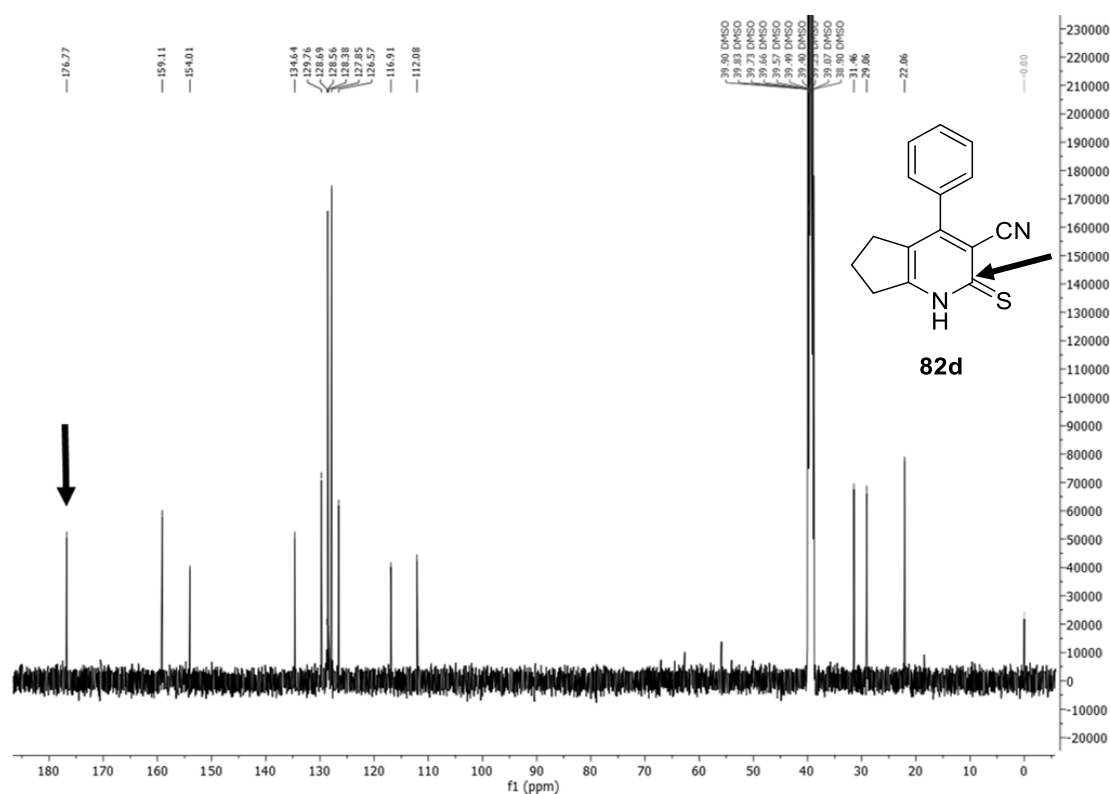
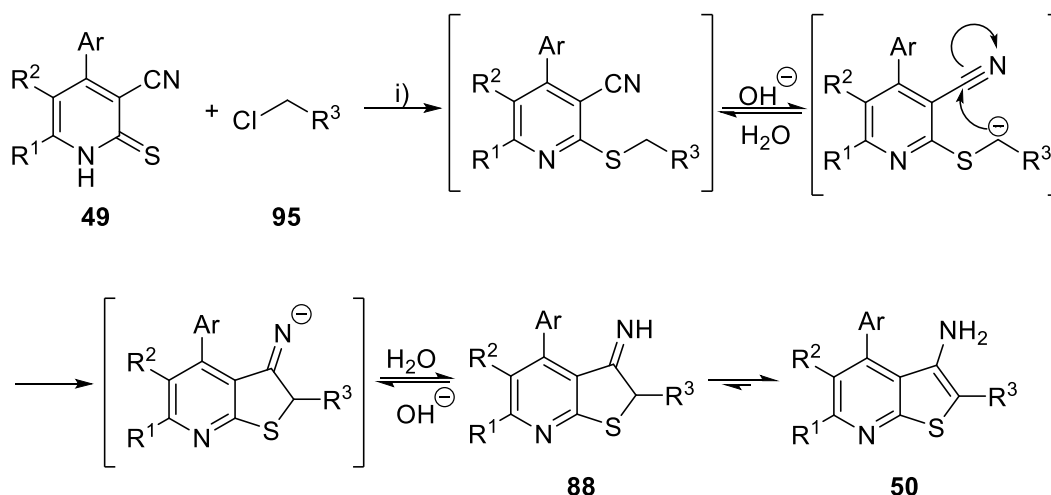


Abbildung 4-7: ^{13}C -NMR-Spektrum von **82d**. Das Vorliegen der Pyridinthion-Form wird durch die chemische Verschiebung des Signals für das Kohlenstoffatom in 2-Position bei etwa $\delta = 176$ ppm (schwarzer Pfeil) bestätigt.

4.5 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide

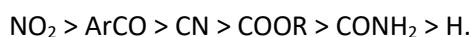
4.5.1 Literaturbekannte Studien zu Synthesemethoden für 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridine durch Thorpe-Ziegler-Zyklisierung

3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridine können in einer zweistufigen Reaktion aus den Pyridinthionen **49** mit entsprechenden Halogen-substituierten Derivaten **95**, die eine elektronenziehende Gruppe R^3 aufweisen, dargestellt werden (Schema 4-25). Dabei erfolgt die Alkylierung des Schwefelatoms im basischen Medium durch nukleophile Substitution am α -Kohlenstoff von **95**. Anschließend wird dieses Kohlenstoffatom deprotoniert, wodurch das entstehende Carbanion nun intramolekular in einer Thorpe-Ziegler-Reaktion am Nitrilkohlenstoffatom angreifen kann. Durch Protonierung des Stickstoffatoms bildet sich das Imin **88**, welches zum 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin **50** tautomerisiert. Das Gleichgewicht liegt vollständig auf der Seite des Amins (Schema 4-25).³¹⁰



Schema 4-25: Alkylierung von **49** und Reaktionsmechanismus der Thorpe-Ziegler-Zyklisierung zur Darstellung der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridine **50**, nach LITVINOV *et al.*³¹⁰ Reaktionsbedingungen: i) DMF, KOH-Lösung.

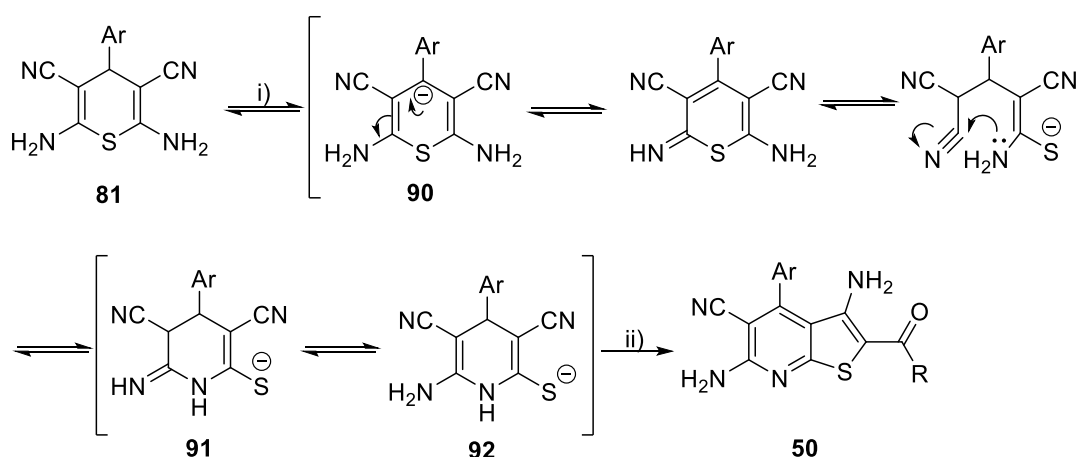
In Übersichtsarbeiten von LITVINOV *et al.* wird außerdem der Einfluss des Alkylans auf die Thorpe-Ziegler-Zyklisierung erläutert. Je stärker die elektronenziehende Gruppe des Alkylierungsreagenzes ist, desto schneller erfolgt die Zyklisierung.^{310,311} Dies wurde bereits durch SHARANIN *et al.* beschrieben, die den Elektronenzug des Alkylans als Grund für die Stabilität und Konzentration des Carbanions beschreiben. Die Stärke des Elektronenzugs sowie der elektrophile Charakter der Nitrilfunktion sind ausschlaggebend für die Zyklisierungsrate.³¹² Der Elektronenzug nimmt wie folgt ab:^{310,311}



SHARANIN *et al.* nutzen zur Abschätzung der Zyklisierungsrate die chemische Verschiebung der Methylengruppe im ¹H-NMR-Spektrum. Diese hängt von der Polarisierung der CH₂-Bindung ab, welche wiederum von dem Elektronenzug des Substituenten abhängt. Der Grad der Polarisierung nimmt mit der o.g. Reihenfolge ab.²⁸⁴

Auch die Substituenten des Pyridinthions nehmen Einfluss auf die gewünschte Zyklisierung. KADUSHKIN *et al.* berichten, dass bei elektronenschiebenden Substituenten in 4-Position des Pyridinthions die Elektronendichte am Kohlenstoff der Nitrilfunktion erhöht wird.³¹³ Hierdurch ist die Fähigkeit, mit dem anionischen CH-Fragment zu reagieren, reduziert. Das Alkylierungs-Reagenz muss in diesem Fall eine stark elektronenziehende Gruppe aufweisen, damit das entstehende Anion am Nitril-Kohlenstoff angreifen kann.³¹³ DYACHENKO *et al.* haben außerdem die 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-Synthese ausgehend von Thiopyranen **81** beschrieben.^{294,314,315}

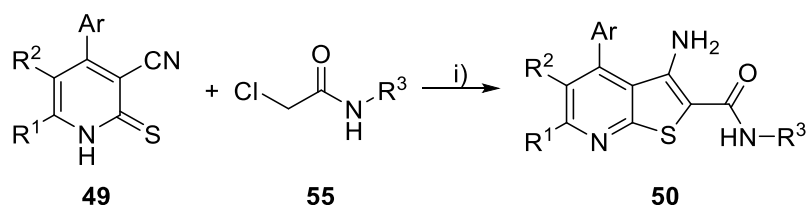
Dabei entsteht im alkalischen Medium bei Raumtemperatur durch Deprotonierung des C⁴-Kohlenstoffs ein instabiles Carbanion **90**, worauf eine Öffnung des Ringsystems folgt. Nach erneutem Ringschluss entsteht durch prototrope Tautomerisierung aus dem Tetrahydropyridin-2-thiolat **91** das 1,4-Dihydropyridin-2-thiolat **92**. Dieses kann anschließend mit einer α -Halogen-Carbonyl-Verbindung zum 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin **50** umgesetzt werden (Schema 4-26).^{294,314}



Schema 4-26: Darstellung von **50** ausgehend von **81**, nach DYACHENKO *et al.*²⁹⁴ Reaktionsbedingungen: i) DMF, KOH_(aq), RT; ii) α -Halogen-Carbonyl-Verbindung, KOH_(aq), RT.

4.5.2 Synthese neuer 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide

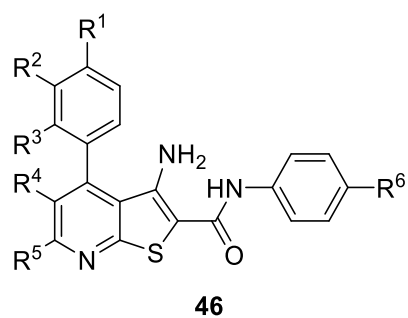
Die in der vorgelegten Arbeit synthetisierten 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47**, in Schema 4-27 zusammengefasst als **50**, wurden nach einer modifizierten Vorschrift von FUGEL *et al.*¹⁷⁴ aus den unter den Abschnitten 4.3 und 4.4 dargestellten Pyridinthion-Derivaten **58** bzw. **82**, in Schema 4-27 zusammengefasst als **49**, mit den 2-Chloracetamid-Derivaten **55** dargestellt.



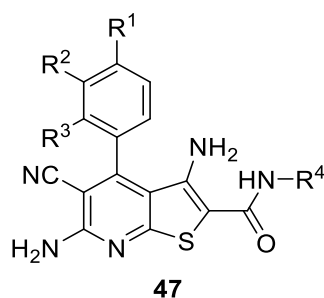
Schema 4-27: Synthese der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **50**. Reaktionsbedingungen: i) 1. DMF, KOH_(aq), RT, 10-30 min; 2. KOH_(aq), 100 °C, 15 min-6 h.

Durch die modifizierte Synthesevorschrift wurden folgende 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** (Tabelle 4-7) bzw. **47** (Tabelle 4-8, Tabelle 4-9) synthetisiert.

Tabelle 4-7: 6-Alkyl-3-amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46a-46l**.



Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
46a	<i>N</i> -Boc-Piperazino	H	Cl	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46b	H	H	H	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46c	H	H	H	-(CH ₂) ₃ -		F
46d	H	H	H	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46e	H	Me	H	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46f	H	Me	H	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46g	H	H	H	(H ₃ C) ₃ COOC-	Me	Cl
46h	H	Me	H	(H ₃ C) ₃ COOC-	Me	Cl
46i	H	Me	H	-COOH	Me	Cl
46j	H	H	H	-COOH	Me	Cl
46k	<i>N</i> -Boc-Piperazino	H	Cl	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46l	<i>N</i> -Boc-Piperazino	H	Cl	H	Me	Cl

Tabelle 4-8: 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanarylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **47a-47ag**.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
47a	H	3-Cl	H	4-ClPh
47b	H	3-F	H	2-ClPh
47c	H	3-Cl	H	2-ClPh
47d	H	3-Cl	H	4-FPh
47e	H	3-Me	H	4-ClPh
47f	H	3-Me	H	2-ClPh
47g	H	3-Me	H	4-FPh
47h	H	3-F	H	4-ClPh
47i	H	3-F	H	4-FPh
47j	H	3-Methoxy	H	4-ClPh
47k	H	3-Me	H	Methyl
47l	H	3-Me	H	Heptyl
47m	H	3-Me	H	Isopropyl
47n	H	3-Me	H	Cyclopropyl
47o	H	3-Me	H	<i>N</i> -(2-Morpholinoethyl)
47p	H	3-Me	H	<i>N</i> -(2-Cyclopropylethyl)
47q	<i>N</i> -Boc-Piperazino	H	Cl	3-ClPh
47r	Piperazino (als Hydrochlorid)	H	Cl	3-ClPh
47s	Morpholino	H	Cl	3-ClPh
47t	Pyrrolidino	H	Cl	3-ClPh
47u	Pyrrolidino	H	Cl	2-ClPh
47v	Morpholino	H	Cl	2-ClPh
47w	Morpholino	H	Cl	4-ClPh
47x	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-amino)ethyl]- <i>N</i> -(methyl)-amino	H	Cl	3-ClPh

Tabelle 4-9: 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanarylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **47a-47ag** (Fortsetzung).

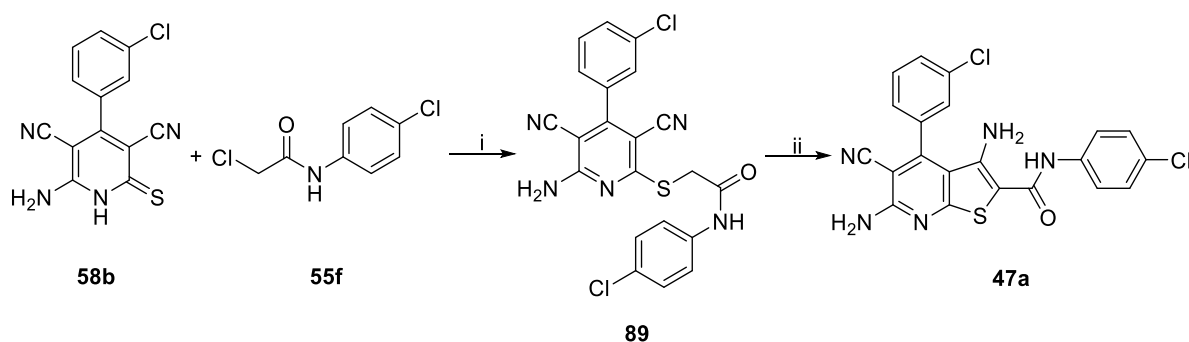
Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
47y	Morpholino	H	Cl	4-FPh
47z	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino	H	Cl	4-ClPh
47aa	Pyrrolidino	H	Cl	4-ClPh
47ab	Pyrrolidino	H	Cl	4-FPh
47ac	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino	H	Cl	4-FPh
47ad	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino	H	Cl	4-FPh
47ae	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino	H	Cl	2-ClPh
47af	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)-amino (als Hydrochlorid)	H	Cl	3-ClPh
47ag	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino	H	Cl	3-ClPh

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte in getrocknetem Dichlormethan mit Trifluoressigsäure unter Argon-Atmosphäre nach einer Vorschrift von ORBAN *et al.*³¹⁶ Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Öl wurde in Propan-2-ol gelöst und das Produkt mit HCl gelöst in Propan-2-ol als Hydrochlorid gefällt. Auf diese Weise wurden die 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **47af** und **47r** dargestellt.

4.5.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Nebenprodukten bei der Synthese von 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamiden

4.5.3.1 Isolierung des unzyklisierten Derivats **89**

Bei der anfangs durchgeführten Synthese der Verbindung **47a** wurde aus **58b** und **55f** in DMF nach KOH-Zugabe bei Raumtemperatur lediglich das unzyklisierte Derivat **89** erhalten. Erst nach erneutem Lösen in DMF, Zugabe von wässriger Kaliumhydroxidlösung und Erhitzen auf 100 °C konnte **47a** erhalten werden (Schema 4-28).



Schema 4-28: Reaktion von **58b** und **55f** zu **89**. Erst nach Erhitzen auf 100 °C konnte die vollständige Zyklisierung zu **47a** gewährleistet werden. Reaktionsbedingungen: i) DMF, 2 Äq. KOH_(aq), RT, 1 h 30 min; ii) DMF; 1 Äq. KOH_(aq), 100 °C, 4 h 30 min.

Eine mögliche Erklärung hierfür kann die relativ schwach elektronenziehende Amid-Gruppe sein, die in der Reaktivitätsreihenfolge (Abschnitt 4.5.1) nahezu am Ende steht. Anhand der chemischen Verschiebung des Signals der Methylengruppe im ¹H-NMR-Spektrum kann die Zyklisierungsrate abgeschätzt werden.²⁸⁴ Die chemische Verschiebung des Signals der Methylengruppe der in dieser Arbeit erhaltenen unzyklisierten Verbindung **89** liegt bei 4.17 ppm. Im Gegensatz hierzu liegen die chemischen Verschiebungen der Methylengruppensignale bei den von FUGEL *et al.*¹⁷⁴ synthetisierten 2-Amino-6-sulfanylpipridin-3,5-dicarbonitril-Derivaten, die anstelle des Amid-Substituenten eine Keto-Gruppe aufweisen, bei 4.80 – 5.04 ppm. Diese Signale liegen tieffeldverschobener als das Signal der Methylengruppe von **89**.

Die Methylengruppe in **89** erfährt eine schwächere Polarisierung durch den Elektronenabzug der Amid-Gruppe. Demzufolge weist **89** eine vergleichsweise geringe Zyklisierungsrate auf, wodurch die fehlende Zyklisierung erklärt werden kann.

4.5.3.2 Röntgenkristallstrukturanalyse von **46d**

Die Bildung der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide wurden am Beispiel von **46d** durch eine Röntgenkristallstruktur belegt (Abbildung 4-8).

Dabei ist erkenntlich, dass sowohl der Thiophen- als auch der Pyridinring planare Strukturen ausbilden. Die Ebenen dieser Ringe sind gegeneinander verwinkelt, was vermutlich aufgrund sterischer Effekte der Substituenten sowie der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bedingt ist. Die Amidgruppe ist um 18.58° in Bezug auf das Thiophen gedreht (Torsionswinkel S(1)-C(2)-C(16)-N(2): $-18.58(10)^\circ$) und bildet intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zum N1 als auch zum S1 aus. In publizierten Daten von vergleichbaren 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamidinen ist das Schwefelatom nicht zwangsläufig an der Bildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.³¹⁴ Der Aromat in 4-Position des Pyridinrings zeigt eine fast senkrechte Anordnung zum Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundgerüst, was auf sterische Wechselwirkungen zurückzuführen ist [Torsionswinkel C(3A)-C(4)-C(10)-C(15): 76.41° und C(4A)-C(4)-C(10)-C(11): 76.99°].

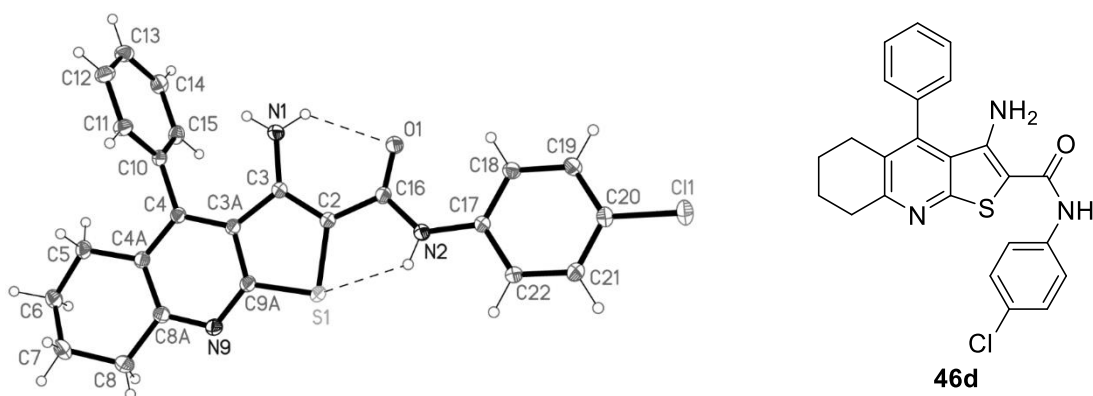


Abbildung 4-8: Röntgenkristallstrukturanalyse von **46d**. Die unterbrochenen Linien stellen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen dar. Die kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

4.5.3.3 Isolierung des Nebenprodukts bei der Aufreinigung von **93**

Die Aufreinigung von **93** wurde durch ein ähnliches Nebenprodukt erschwert. Zuvor konnte die Boc-geschützte Verbindung **46a** nicht aufgereinigt werden, weshalb sie unrein der Boc-Entschützung unterworfen wurde.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde im ^1H -NMR-Spektrum ein doppelter Signalsatz beobachtet (Abbildung 4-10|A). Ausgenommen hiervon waren die Signale des Cyclopentanrings. Anstelle dessen waren zusätzliche Signale bei 2.62 ppm (Integral für 3H) bzw. 7.08 ppm (Integral für 1H) vorhanden (schwarze Pfeile). Die Cyclopentaneinheit war dementsprechend durch eine Methylgruppe ersetzt, was auf die Reaktion des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid-Derivats **61** mit Aceton zurückgeführt wurde. Durch gezielte Synthese von **94** konnte die Reaktion mit Aceton bestätigt werden (Abbildung 4-10|B).

Aceton wird z.B. zur Reinigung der Glasgeräte verwendet. Restmengen an den Glasgeräten, die nach der Reinigung noch vorhanden waren, führten bei der Synthese von **93** offensichtlich zur Entstehung des Nebenprodukts **94**.

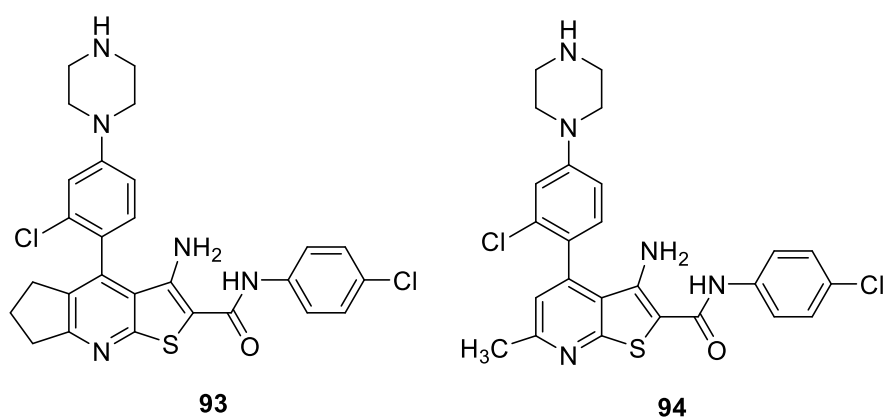


Abbildung 4-9: Die Boc-entschützte Cyclopentan-anellierte Verbindung **93** und die detektierte Verunreinigung **94**.

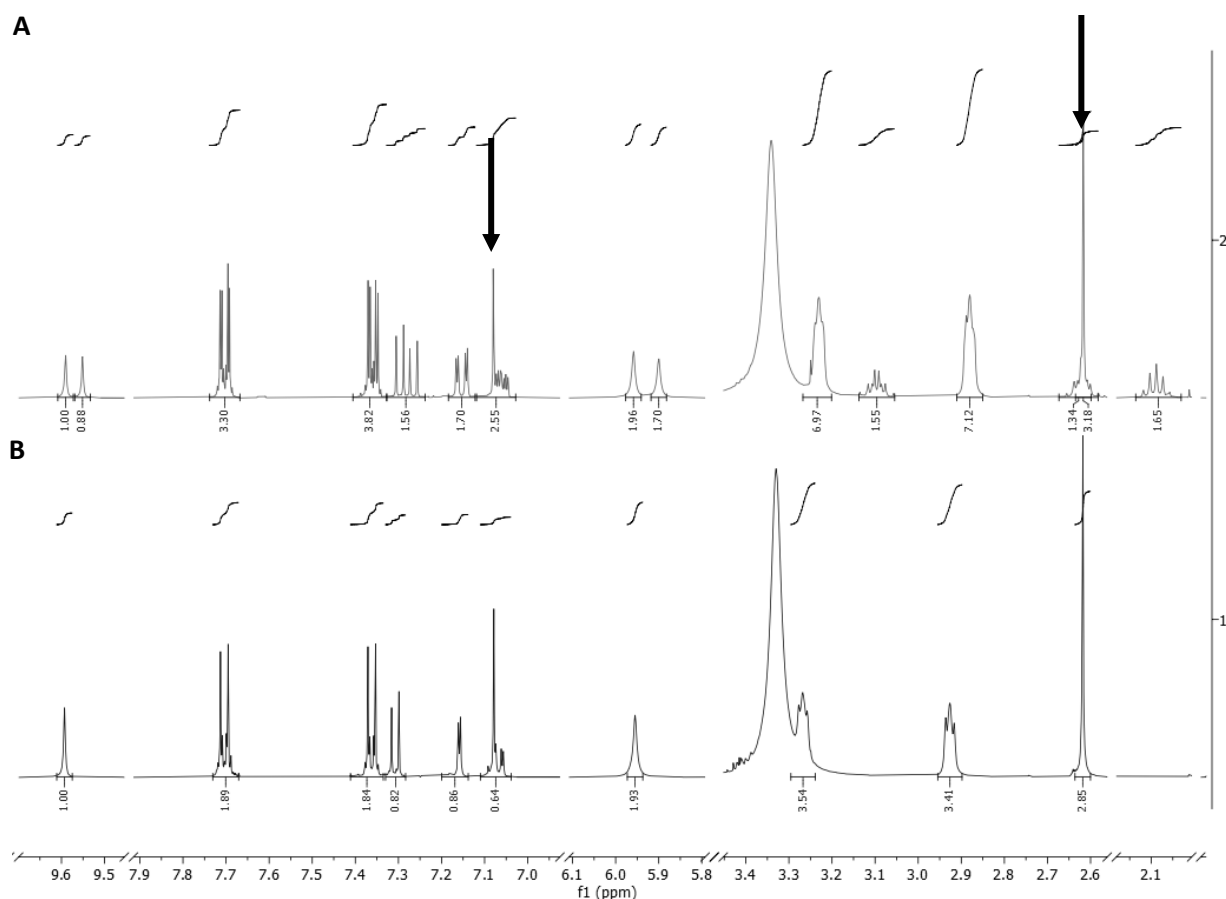


Abbildung 4-10: ^1H -NMR-Spektren von dem Gemisch aus **93** und **94** (A) und der isolierten Verbindung **94** (B). Die durch einen schwarzen Pfeil hervorgehobenen Signale sind der Methylgruppe, bzw. dem aromatischen Proton von **94** zuzuordnen. Die Cyclopentan-Einheit in **B** fehlt vollständig.

4.5.3.4 Modifizierung der Reaktionsbedingungen bei der Synthese von 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamiden

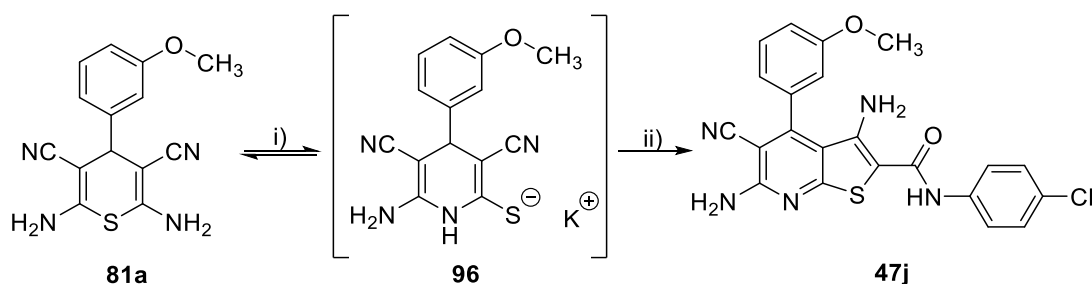
Die Aufreinigungen der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide waren aufgrund der unrein eingesetzten Pyridinthione **49** teilweise sehr aufwendig. Neben der Verwendung von DMF als Lösungsmittel ist die Zyklisierung mit Amid-haltigen Alkylantien unter Refluxbedingungen in Ethanol bekannt.³¹⁷ DMF kann sich im alkalischen Milieu zu Dimethylamin und Kohlenstoffmonoxid zersetzen.³¹⁸ Eine Einflussnahme auf die Synthese und somit auch auf die anschließende Aufreinigung ist hierdurch denkbar.

Beispielhaft wurde **47j** sowohl in DMF, als auch in Ethanol dargestellt. Nach Beenden der Reaktion in DMF musste das Produkt säulenchromatographisch sowie mittels Umkristallisation aufgereinigt werden. Durch die doppelte Aufreinigung konnte eine Ausbeute von 8% erzielt werden. Der Reaktionsansatz in Ethanol wurde hingegen nur einfach säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeute lag bei 59%. Durch Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel wurde somit die Aufreinigung für **47j** erleichtert und die Ausbeute erhöht.

Eine Anwendung dieser modifizierten Reaktionsbedingungen auf weitere 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid-Derivate wurde nicht durchgeführt.

4.5.4 Synthese des 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids aus einem Thiopyran

Das Thiopyran **81a** aus Abschnitt 4.3.3.1 wurde für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids **47j** zur Verfügung gestellt. Dabei wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von DYACHENKO *et al.*^{294,314,315} **81a** in alkalischer DMF-Lösung bei Raumtemperatur gelagert. Über die Zwischenstufe des thermodynamisch kontrollierten 1,4-Dihydropyridinthiolats **96**, welches nicht isoliert wurde, konnte das Produkt **47j** nach Zugabe von 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid, zwei Äquivalenten wässriger Kaliumhydroxidlösung und Erhitzen des Ansatzes auf 100 °C gewonnen werden (Schema 4-29).



Schema 4-29: Darstellung von **47j** ausgehend von **81a**, modifiziert nach DYACHENKO *et al.*³¹⁴ Reaktionsbedingungen: i) DMF, KOH_(aq), RT, 24 h Lagerung; ii) 1. 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid, KOH_(aq), RT, 3 h, 2. KOH_(aq), RT (2 h); 100 °C (3 h); 55%.

4.6 Analytische Besonderheiten

4.6.1 NMR-Analyse von 46l

Im ¹³C-NMR-Spektrum von **46l** fehlt ein Signal für einen tertiären Kohlenstoff (Abbildung 4-11|B, schwarzer Pfeil), welches jedoch im DEPT135-Spektrum sichtbar ist (Abbildung 4-11|A, schwarzer Pfeil). Dies kann durch den Aufbau des Experimentes begründet werden. Durch die DEPT-Pulsfolge wird die größere Populationsdifferenz des gebundenen empfindlichen ¹H-Kerns auf den unempfindlichen ¹³C-Kern übertragen. Deshalb ist die Wiederholungsrate von der Relaxationszeit *T*₁ der Protonen und nicht von der Relaxationszeit *T*₁ der Kohlenstoffe abhängig. Da *T*₁ von ¹H-Kernen kürzer als von ¹³C-Kernen ist, kann die Akkumulation der Daten mit einer kürzeren Wartezeit erfolgen. Dies führt bei gleicher Messzeit zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis, was deutlich im Spektrum zu sehen ist. Im ¹³C-Spektrum ist das Signal bei 121.9 ppm also im Rauschen untergegangen.

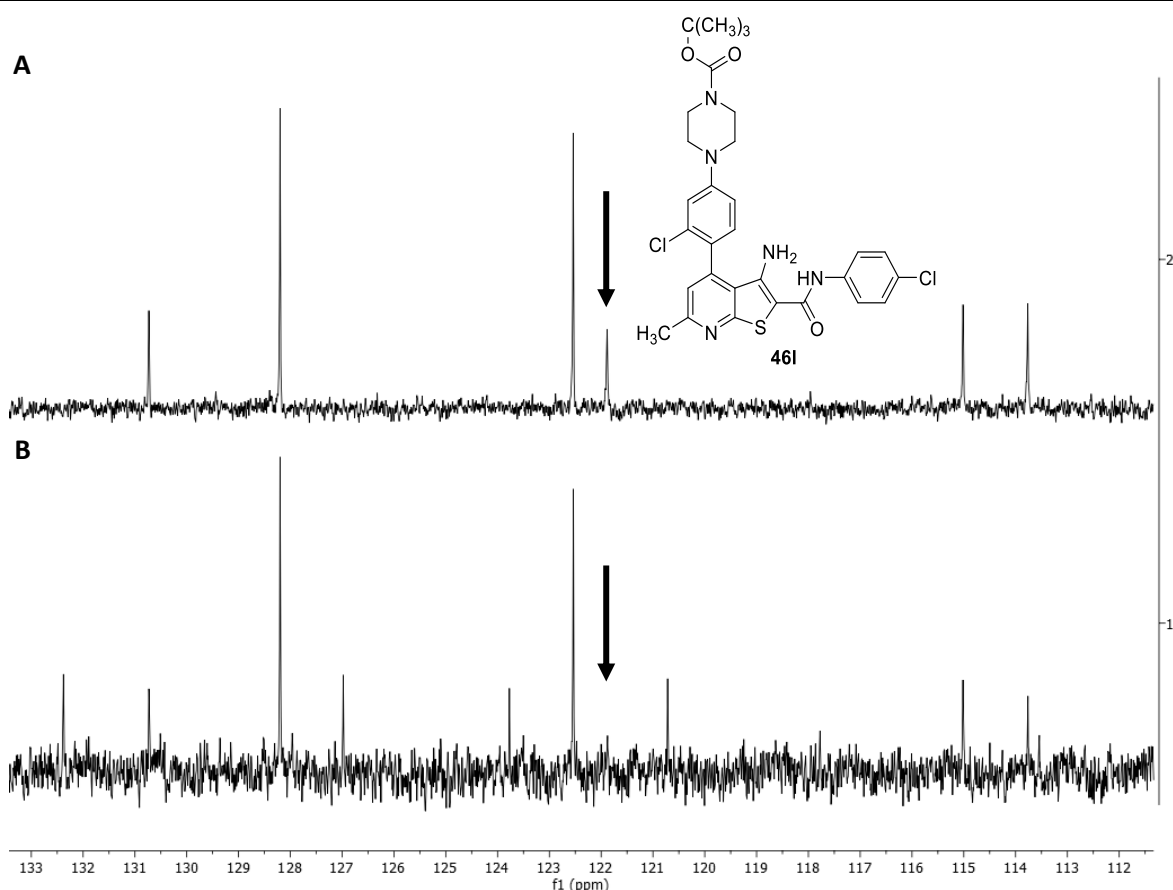


Abbildung 4-11: Ausschnitt des DEPT135-Spektrums **A** und des ¹³C-NMR-Spektrums **B** von **46l**. **A**: Der schwarze Pfeil zeigt das Signal, welches im ¹³C-NMR-Spektrum (**B**, schwarzer Pfeil) fehlt.

4.6.2 Unbekanntes Signal im IR-Spektrum von **46j**

Das IR-Spektrum von **46j** weist ein Signal bei $\sim 1940 \text{ cm}^{-1}$ auf (Abbildung 4-12). Dieses Signal ist den Oberschwingungen des Pyridins zuzuordnen.^{319,320} Auch IR-Spektren von weiteren Nicotinsäurederivaten (vgl. 2-Aminonicotinsäure, 2-Chlorisonicotinsäure, 2-Chlornicotinsäure) in der *Spectral Database for Organic Compounds* weisen diese Signale auf.³²¹ Oberschwingungen entstehen, wenn durch Absorption von IR-Licht die Atome aus dem Grundzustand nicht nur auf das zur Grundschiwingung führende erste Schwingungsniveau, sondern zusätzlich auf das zweite Schwingungsniveau angeregt werden. Die Oberschwingungen befinden sich bei nahezu genau der doppelten Wellenzahl wie die Grundschiwingung. Ein vergleichbares Signal wurde bei **46i** beobachtet, welches ebenfalls eine Isonicotinsäurestruktur aufweist (IR-Spektrum nicht abgebildet).

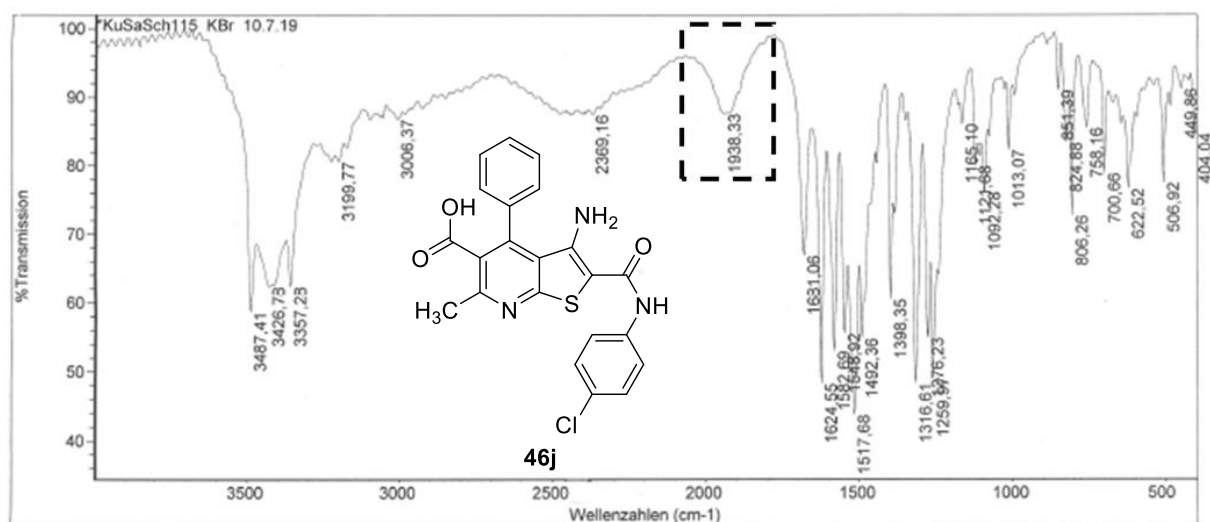


Abbildung 4-12: IR-Spektrum der Verbindung **46j** mit einem Oberschwingungssignal bei $\sim 1940\text{ cm}^{-1}$ (schwarz unterbrochenes Rechteck).

4.6.3 Fehlendes Kohlenstoffsignal bei den Boc-geschützten Piperazinderivaten

Bei Verbindungen mit einer Boc-geschützten Piperazin-Teilstruktur wurde jeweils nur ein CH_2 -Signal für diese Teilstruktur im ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert. Normalerweise würden aufgrund der chemischen Äquivalenz zwei Signale für je zwei Kohlenstoffatome erwartet werden.

Durch ein HSQC-NMR-Spektrum wird beispielhaft für **46a** gezeigt, dass vier Protonen unter einem nicht detektierbaren Kohlenstoffatom-Signal liegen (Abbildung 4-13).

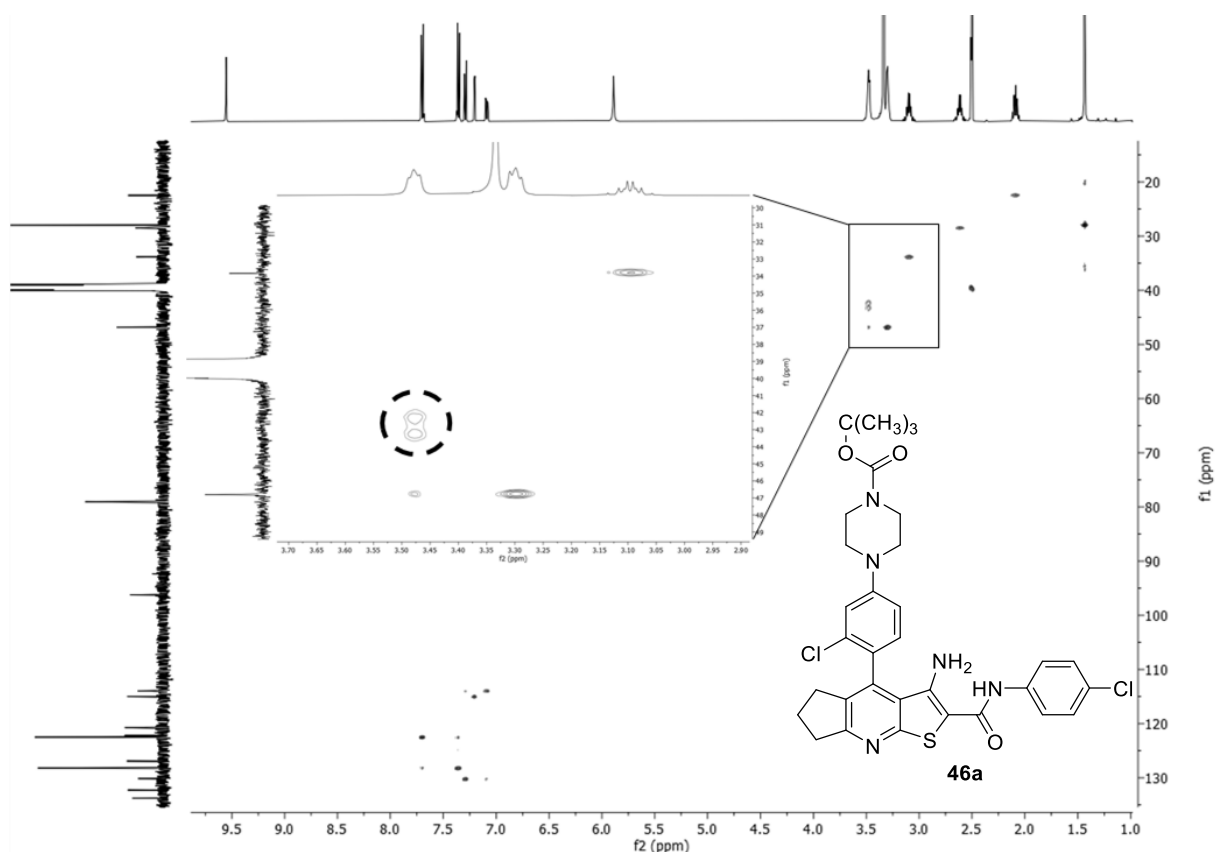


Abbildung 4-13: HSQC-NMR-Spektrum von **46a** und vergrößerter Ausschnitt aus dem relevanten Bereich der Piperazin-Protonensignalen. Der schwarz unterbrochene Kreis bestätigt die 4 Protonen unter einem nicht sichtbaren Kohlenstoff-Signal.

4.6.4 Dynamische Differenzkalometrie

Für **47l** und **47n** wurden mehrere Schmelzintervalle mit der Kapillarmethode beobachtet. Um diese zu ermitteln, wurde die dynamische Differenzkalometrie (DSC, engl. = *differential scanning calorimetry*) genutzt. Dabei werden sowohl die Probe als auch eine Referenz einer konstanten Temperaturerhöhung ausgesetzt. In Folge von Modifikations- oder Phasenänderungen (z. B. Schmelzen) kommt es zwischen der Probe und der Referenz zu Temperaturdifferenzen. Aus diesen gemessenen Temperaturdifferenzen wird der Wärmestrom ermittelt.

Abbildung 4-14 zeigt beispielhaft ein DSC-Spektrum von **47l**. Dabei wurde der Wärmestrom pro Probenmenge gegen die Temperatur aufgetragen. Eine fallende Kurve zeigt hier das Schmelzen der Probe; eine steigende Kurve zeigt das Rekristallisieren. Durch Ermittlung des Schnittpunkts der ersten Wendetangente mit der Basislinie wird der als Onset-Temperatur bezeichnete Anfangsschmelzpunkt bestimmt. Der Schnittpunkt der zweiten Wendetangente mit der Basislinie weist den als Offset-Temperatur bezeichneten Endschmelzpunkt auf. Mit Hilfe der DSC wurden für **47l** drei Schmelzpunkte sowie eine Rekristallisation beobachtet. Das Auftreten mehrerer Schmelzpunkte kann z. B. durch verschiedene polymorphe Formen dieser Verbindung hervorgerufen werden.

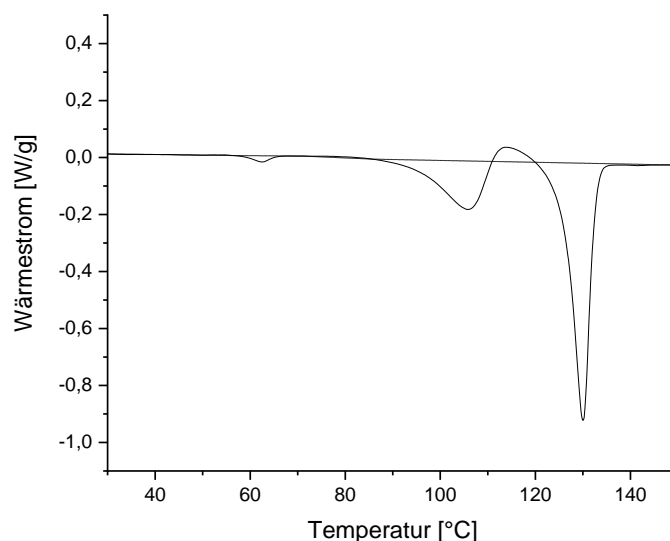


Abbildung 4-14: DSC-Thermogramm von **47I** mit den Onset-Temperaturen von 58 °C, 94 °C, 126 °C. Auf der x-Achse ist die Temperatur aufgetragen; auf der y-Achse der Wärmestrom pro Probenmenge.

4.6.5 HPLC-Messungen

Vor der biologischen Testung der Endstufen wurde die Reinheit mit verschiedenen Methoden evaluiert. Hierdurch ist gewährleistet, dass die biologische Aktivität durch die analysierte Substanz und nicht durch bekannte oder unbekannte Verunreinigungen hervorgerufen wird. Neben Elementar- und NMR-Analysen wurde die Reinheit auch mittels HPLC bestimmt. HPLC steht für *high performance liquid chromatography* und stellt ein chromatographisches Trennverfahren dar. Der Begriff Chromatographie wurde von Mikail S. Tswett geprägt und bedeutet übertragen „Farbschreibung“. Die zu untersuchende Probe wird hierbei über eine Trennsäule geführt und kann in Wechselwirkung mit deren stationärer Phase treten. In Folge von unterschiedlichen Wechselwirkungen der Substanzen kommt es zu unterschiedlichen Retentionszeiten an der stationären Phase. Somit eluieren diese zeitversetzt, was u.a. mit einem *diode array detector* (DAD) ermittelt werden kann. In diesem Fall ist zur Detektion die Absorption von Licht eine Voraussetzung.³²² Durch Integration der Flächen unter der Kurve kann der Anteil der jeweiligen Verbindung in der Probe berechnet werden, sofern die jeweiligen Absorptionskoeffizienten der zu trennenden Substanzen bekannt sind.

In dieser Arbeit wurde die Reinheit an zwei verschiedenen HPLC-Systemen analysiert. Der Anteil der Verunreinigungen in einer für die biologische Testung bereitgestellten Substanzprobe sollte unter fünf Prozent liegen. Die zwei unterschiedlichen Systeme verhindern das Auftreten systemspezifischer Fehler durch eine unabhängige und redundante Testmethodik. Da die Absorptionskoeffizienten der Hauptkomponente und der beobachteten Verunreinigungen jeweils unbekannt waren, wurden die Chromatogramme anschließend mit Hilfe der 100%-Methode ausgewertet. Dabei ergibt die Summe aller integrierten Peaks 100%.

Bei der Auswertung einiger Verbindungen fiel auf, dass die generierten Integralwerte bei Verwendung der gleichen Methode beider Systeme nicht identisch sind. Teilweise ergab sich somit ein Anteil der Hauptkomponente unterhalb der geforderten Spezifikation von 95%. Außerdem waren die Retentionszeiten trotz Verwendung der gleichen Methode nicht identisch.

Einen möglichen Erklärungsansatz bieten die unterschiedlichen Systeme. Es wurde einerseits das Merck Hitachi Elite LaChrom System (Hitachi High Technologies Corporation, Tokio, Japan) mit dem DAD L-2450, hier als HPLC-System 1 bezeichnet, verwendet. Andererseits wurde das VWR Hitachi Chromaster System (Hitachi High Technologies Corporation, Tokio, Japan) mit einem DAD 5430, hier als HPLC-System 3 bezeichnet, genutzt. Die definierten Parameter der Datenerfassung sowie der Datenverarbeitung nehmen direkten Einfluss auf die Qualität der generierten Chromatogramme.

Während der Datenerfassung bestimmt die Datensammelrate (*sampling rate*) die Anzahl an Datenpunkten, die pro Sekunde aufgenommen werden. Die Schrittweite (*sampling period*) stellt den reziproken Wert der Datensammelrate dar. Eine ausreichende Datensammelrate ist nötig, um einen Peak genau definieren zu können. Allerdings hindert eine zu große Datensammelrate die optimale Definition der Peakerkennungsparameter. Außerdem wird mehr Speicherplatz benötigt und die Rechenzeit ist dadurch länger. Während der Datenerfassung und -verarbeitung kann ein *bunching* oder *smoothing* durchgeführt werden. *Bunching* bezeichnet die Zusammenfassung mehrerer Datenpunkte zu einem Einzelnen. *Smoothing* bezeichnet die Verschiebung einzelner Datenpunkte anhand einer definierten *smoothing*-Funktion zur Glättung der Messdaten. Diese Parameter beziehen sich je nach Hersteller noch auf die Datenerfassung oder schon auf die Datenverarbeitung. Die *width* definiert den Bereich, in dem die zu bestimmende Anzahl an Messdatenpunkten zu erreichen ist. Dadurch können die innerhalb dieses Bereichs liegenden Messdatenpunkte erneut geglättet werden.³²²

Im HPLC-System 1 wurde das EZChrom Elite System Version 3.3.2 SP2 verwendet. Bei diesem System wird die Peakerkennung über die Parameter *width* und *threshold* angepasst. Die Daten wurden mit einer *sampling period* von 400 ms aufgenommen. Die Messpunkte werden mit der Savitsky-Golay-*smoothing*-Funktion über neun Messpunkte mit gerätespezifischen Werten faktorisiert und geglättet.

Formel 4-1: Savitsky-Golay-Funktion mit den festgelegten Faktoren im HPLC-System 1.

$$\frac{a_1 f_1 + a_2 f_2 + \dots a_9 f_9}{norm} \frac{a_2 f_1 + a_3 f_2 + \dots a_{10} f_9}{norm} \frac{a_3 f_1 + a_4 f_2 + \dots a_{11} f_9}{norm}$$

Mit f_1 : -21, f_2 : 14, f_3 : 39, f_4 : 54, f_5 : 59, f_6 : 54, f_7 : 39; f_8 : 14; f_9 : -21 und *norm*: 231.0.

Die Hersteller der Software empfehlen für eine optimale Integration den schmalsten Peak durch 20 Messpunkte zu definieren.

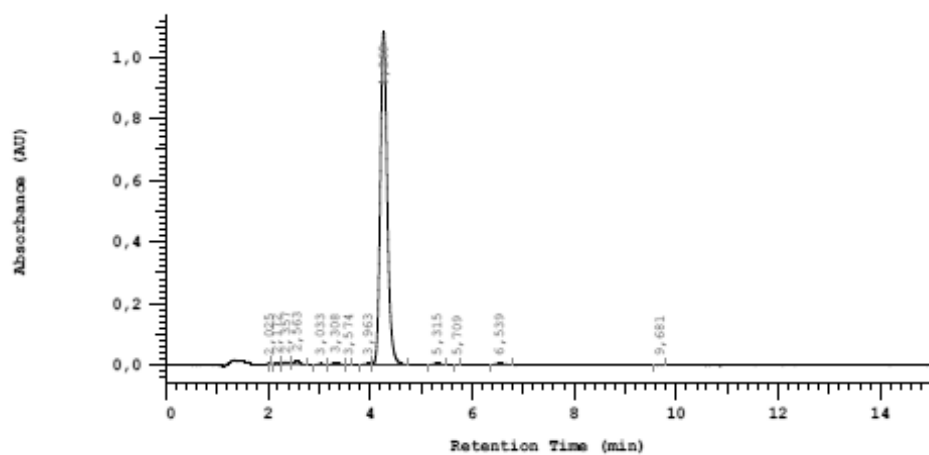
Wenn ein Peak durch mehr als 20 Datenpunkte beschrieben wird, werden die Daten vor Anwendung des Integrationsalgorithmus mit Hilfe des *width*-Parameters gemittelt. Dabei werden lediglich zu viele Daten, aber nicht zu wenig generierte Daten korrigiert. Hierdurch werden dem Integrationsalgorithmus max. 20 Datenpunkte zur Verfügung gestellt. Weiterhin empfehlen die Hersteller eine manuelle *width* zu setzen, wenn eine doppelte Peakbreite gegeben ist. Neben der *width* wird die Integration durch den Parameter *threshold* beeinflusst. Dieser stellt die erste Ableitung der Funktion des Graphen dar und erlaubt dem Integrationsalgorithmus den Anfang und das Ende eines Peaks zwischen dem Basislinienrauschen und einem *drift* zu unterscheiden. Ein *drift* stellt das lineare Steigen oder Fallen der Basislinie dar. Die Hersteller empfehlen für den *threshold* den höchsten Wert der ersten Ableitung eines Abschnitts des Chromatogramms zu verwenden. Dieser wurde anhand der SOP in der vorliegenden Arbeit auf 1000 festgelegt. Je größer dieser Wert ist, desto eher werden kleine, jedoch evtl. valide Peaks nicht detektiert. Zusätzlich kann über die Funktion „*minimum area*“ die minimal zu integrierende Peakfläche definiert werden. Hierdurch kann das Grundrauschen reduziert werden. Dieser Wert wurde in dem vorliegenden Chromatogramm nicht definiert. Der Parameter *shoulder sensitivity*, der die zweite Ableitung der Funktion darstellt, hat Einfluss auf die Erkennung von Nebenpeaks und ermöglicht den Ausschluss fehlerhafter Nebenpeaks. Als *shoulder sensitivity* sollte der höchste Wert der zweiten Ableitung des Chromatogrammabschnitts genutzt werden.³²³

Im HPLC-System 3 wurde das Chromaster System Manager Version 1.1 verwendet. Die Daten wurden mit einer *sampling period* von 50 ms aufgenommen. Im Vergleich zum HPLC-System 1 wird dementsprechend die achtfache Menge an Messdatenpunkten generiert. Die Detektion des Peaks erfolgt durch Abgleich aufeinanderfolgender Messdaten. Bei Übersteigen des Schwellenwerts von fünf aufeinander folgenden Datenpunkten wird in diesem System ein Peak detektiert. Hier stellt der Schwellenwert der Peak-Detektion das Produkt aus Rauschen und *sensitivity* dar. Das Rauschen (*noise*) ist die Differenz zwischen dem kleinsten und größten Datenpunkt in einem definierten Abschnitt des Chromatogramms. Häufig wird hier die 20-fache Halbwertsbreite des zu untersuchenden Peaks genommen. In dem Chromaster System Manager kann das Rauschen einen Wert von 1–8000 mV annehmen. Dieser Rauschwert wird anfangs gemessen und abgespeichert. Wenn kein Wert zur Verfügung steht, kann ein definierter *noise*-Wert genutzt werden. In dem dargestellten Chromatogramm lag dieser gem. SOP bei fünf. Darüber hinaus bestimmt die *sensitivity* den Schwellenwert der Peak-Detektion. Der sensitivste Wert ist in diesem System eins; der unsensitivste Wert 255. In dem vorliegenden Chromatogramm wurde die *sensitivity* gem. SOP auf zehn eingestellt. Darüber hinaus kann mit dem Parameter *N-Method* die Basislinie modifiziert werden. *N* stellt dabei die Anzahl an Peaks dar, unter denen eine unabhängige Basislinie ermittelt werden soll. Der Bereich liegt zwischen 0-100. Hier wurde dieser Parameter gem. SOP auf null festgelegt, sodass diese Funktion ausgestellt wurde.

Bei dieser HPLC können zusätzlich in der digitalen Messdatenverarbeitung die Parameter *bunching* oder *smoothing* gewählt werden. Gemäß der SOP wurde diese wiederholte Glättung der Daten ausgestellt. Die *smoothing*-Funktion erfolgt vor der Peak-Detektion und der Basislinienermittlung. Auch dieses System nutzt die Savitzky-Golay-Funktion. Diese kann im Gegensatz zur HPLC-System 1 variabel auf 5-25 Punkten angewendet werden. Ein höheres *smoothing*-Intervall führt zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis. Allerdings kann ein zu breit angelegtes *smoothing*-Intervall zu Verzerrungen der Signale führen. Eine gute Balance zwischen einem reduzierten Rauschen und einer tolerablen Reduktion der Datengenauigkeit sollte angestrebt werden. Die Hersteller empfehlen bei Anwendung eines *smoothings* eine Anzahl von x Datenpunkten, wobei x ein Viertel bis ein Drittel der im schmalsten Peak vorliegenden Datenpunkte entsprechen sollte.³²⁴

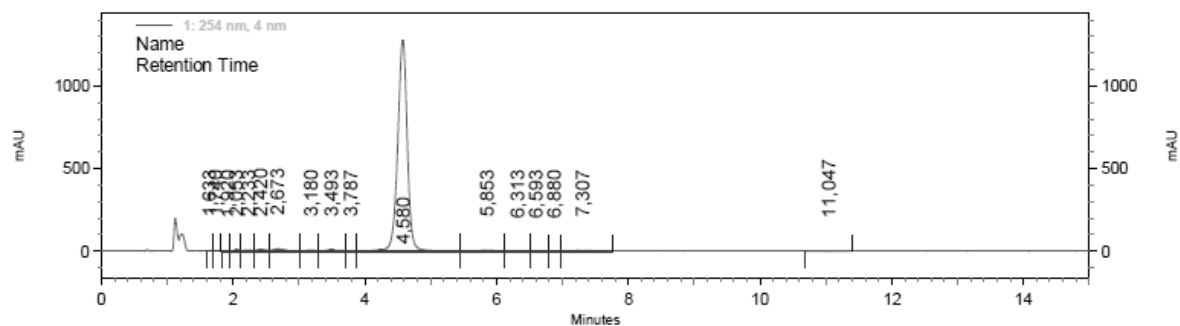
Zusammenfassend sind die Systeme aufgrund der unterschiedlich zu definierenden Parameter nicht direkt miteinander vergleichbar. Hinsichtlich der achtfach höheren Aufnahme an Messdatenpunkten sowie des nicht durchgeführten *smoothing*-Algorithmus in der digitalen Messdatenverarbeitung kann allerdings das HPLC-System 3 als sensibler angesehen werden.

Beispielhaft ist eine HPLC-Analyse beider Systeme von **47h** dargestellt. Man erkennt deutlich die unterschiedlich integrierten Peakflächen. Daneben sind auch die gering unterschiedlichen Bruttoretentionszeiten ($t_{ms}(\text{HPLC-System 1})$: 4.6 min; $t_{ms}(\text{HPLC-System 3})$: 4.3 min) auffällig. Diese können u.a. aus dem unterschiedlichen Alter der Säule resultieren.



No.	Name	RT	Area	Area %	BC
1		2,025	1052	0,020	BB
2		2,172	8122	0,157	BV
3		2,357	33178	0,642	VV
4		2,863	41117	0,796	VB
5		3,033	12985	0,251	BB
6		3,308	23859	0,464	BV
7		3,574	2746	0,053	VB
8		3,863	14789	0,286	BV
9	47h	4,269	4967154	96,180	VB
10		5,315	21425	0,415	BB
11		5,709	376	0,007	BB
12		6,539	35917	0,695	BB
13		9,681	1612	0,031	BB
			5164432	100,000	

Abbildung 4-15: HPLC-Chromatogramm (isokratische Methode ACN/H₂O 60:40) von **47h** mit dem HPLC-System 3. RP-18-Säule; DAD: 5430; Injektionsvolumen: 4 µL; Konzentration der Probe: 0.38 mM.



1: 254 nm, 4 nm

Results				
<i>Pk #</i>	<i>Name</i>	<i>Retention Time</i>	<i>Area Percent</i>	<i>Area</i>
1		1,633	0,017	9144
2		1,740	0,045	24837
3		1,920	0,015	8069
4		2,053	0,241	132069
5		2,233	0,335	183464
6		2,420	0,599	328001
7		2,673	1,169	640593
8		3,180	0,377	206754
9		3,493	0,790	432869
10		3,787	0,175	95907
11	47h	4,580	94,064	51528281
12		5,853	0,790	432603
13		6,313	0,232	126916
14		6,593	0,110	60329
15		6,880	0,051	28066
16		7,307	0,860	471076
17		11,047	0,130	71168
Totals			100,000	54780146

Abbildung 4-16: HPLC-Chromatogramm (isokratische Methode ACN/H₂O 60:40) von **47h** mit dem HPLC-System 1. RP-18-Säule; DAD: L-2450; Injektionsvolumen: 4 µL; Konzentration der Probe: 0.38 mM.

5 Stabilitätsuntersuchungen von 46f

Antimalariawirkstoffe werden überwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten benötigt. Eine ausreichende Stabilität der potenziellen Arzneistoffkandidaten gegenüber erhöhter Temperatur sowie Lichteinfluss ist dementsprechend eine notwendige Eigenschaft, die im Voraus beachtet werden muss. Beispielhaft wurde die Stabilität der in der vorgelegten Arbeit aktivsten Verbindung **46f** untersucht. Dazu wurde die Verbindung in ein Whatman Mini-UniPrep® Vial (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingewogen und in DMSO oder DMSO/Wasser gelöst. Die finale Konzentration der Lösungen betrug 2.5 mM. Die Wasserkonzentration der Gemische betrug 10%. Um eine vollständige Lösung zu gewährleisten, wurde die Substanz zunächst in DMSO gelöst und anschließend vorsichtig Wasser hinzugegeben. In Anlehnung an die ICH Guidelines *ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products* und *ICH Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products* wurden die auf diese Weise präparierten Proben bei Raumtemperatur (19 – 24 °C) und bei 40 °C gelagert. Aluminiumfolie diente in einer Testreihe dem Ausschluss von Licht. Außerdem wurde der Verschluss der Probenverhältnisse zum Schutz vor Feuchtigkeitsverlust mit Parafilm umhüllt. Die Proben wurden in definierten Zeitabständen über eine Gesamtdauer von etwa sechs Monaten mittels HPLC (System 3, Gradientenmethode, Auswertung bei 254 nm und 280 nm) vermessen.

In den in einem DMSO/Wasser-Gemisch gelösten Proben fiel bei Lagerung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur bereits nach 29 Tagen ein Niederschlag aus, der aus der eingesetzten Verbindung **46f** bestand. Dies führte zu einem Ausschluss dieser Proben für weitere Messungen. Auch die unter diesen Bedingungen gelagerten DMSO-Proben wiesen nach 50 Tagen einen Niederschlag auf, sodass auch hier lediglich über ein begrenztes Zeitintervall vermessen wurde. Die Proben zeigten nach den entsprechenden Zeiträumen nur geringfügige Zersetzungen auf (Anteil von **46f** gem. HPLC in der DMSO/Wasser-Probe nach 29 Tagen 96.0% und in der DMSO-Probe nach 50 Tagen 92.5%). Zu Beginn (Tag 0) betrug der Anteil von **46f** gem. HPLC in der DMSO/Wasser- sowie in der DMSO-Probe 98.1%.

Außerdem wurde die Verbindung auch als Feststoff nach entsprechender Lagerung im Dunkeln mittels HPLC untersucht. Diese Proben wiesen keinerlei Zersetzungsprodukte auf und werden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 40 °C für einen Zeitraum von etwa sechs Monaten als stabil eingeordnet.

Die bei 40 °C gelagerten und in DMSO oder DMSO/Wasser gelösten Proben wiesen eine geringfügige Zersetzung mit nicht spezifizierten Verunreinigungen auf. Demzufolge wird **46f** mit einer HPLC-Reinheit von 93.1% nach Lagerung im Dunkeln bei 40 °C für etwa sechs Monate in DMSO/Wasser als annähernd stabil eingestuft (Abbildung 5-1). Zu Beginn (Tag 0) betrug der Anteil von **46f** gem. HPLC in der DMSO/Wasser-Probe 98.8%.

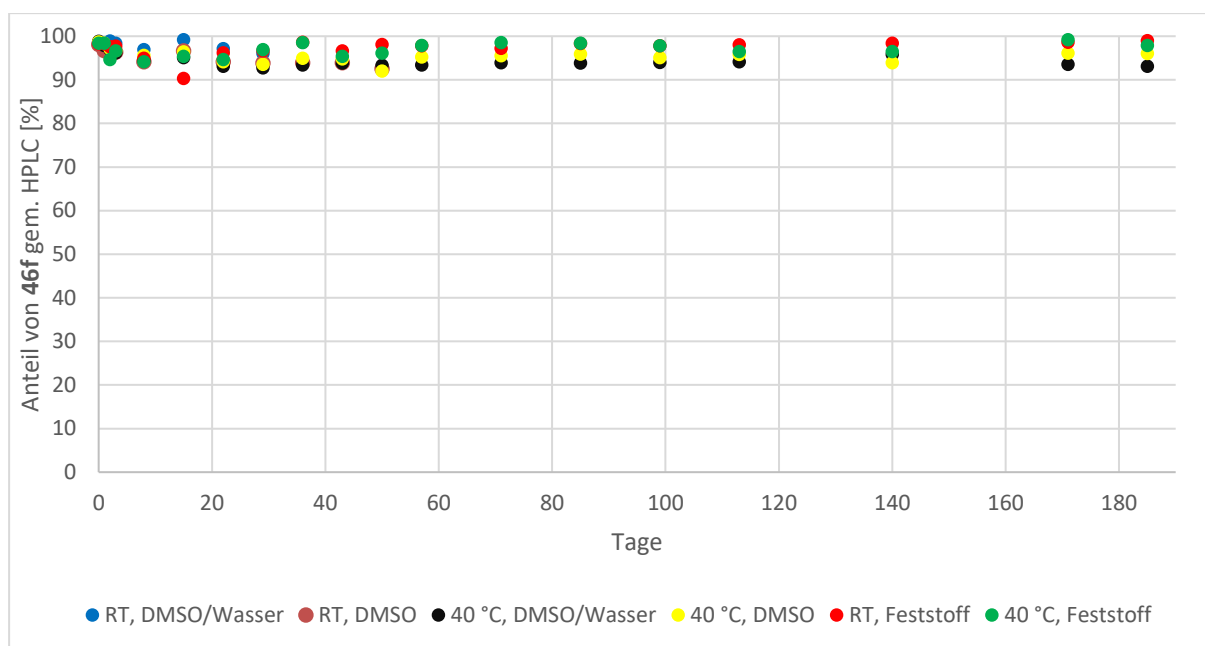


Abbildung 5-1: Detektierte HPLC-Reinheit der Stabilitätsuntersuchungen von **46f**, die in DMSO, DMSO/Wasser-Gemischen oder als Feststoff gelagert und zu gegebenen Zeitpunkten vermessen wurde. Die Proben wurden unter Lichtausschluss entweder bei Raumtemperatur (RT) oder bei 40 °C gelagert.

Nach Lagerung der Probe unter Lichteinfluss wurde dagegen eine schnelle Zersetzung beobachtet. Dabei wurde ein Hauptzersetzungsprodukt detektiert. Um eine Reproduzierbarkeit des Versuchs zu gewährleisten und um das entsprechende Zersetzungsprodukt identifizieren zu können, wurde in einem Quarzkolben eine 30 mM Lösung von **46f** in DMSO/Wasser hergestellt. Der Wasseranteil lag bei 5%, da bei höheren Wasseranteilen eine vollständige Lösung über die Reaktionszeit nicht gewährleistet werden konnte. Diese Probe wurde für zehn Tage mit einer Wellenlänge von 366 nm bei Raumtemperatur (26-27 °C) bestrahlt. Dabei wurde eine annähernd lineare Abnahme von **46f** sowie eine annähernd lineare Zunahme des Zersetzungsprodukts beobachtet. Ab dem zehnten Tag wurde trotz noch vorhandenen Edukts keine weitere Bildung des Zersetzungsprodukts beobachtet (Abbildung 5-2). Stattdessen bildeten sich vermehrt nicht identifizierte Nebenprodukte, sodass das Experiment beendet wurde. Der Ansatz wurde mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Eine Identifikation des Produkts mit Hilfe von NMR- und IR-Analysen verlief nicht erfolgreich.

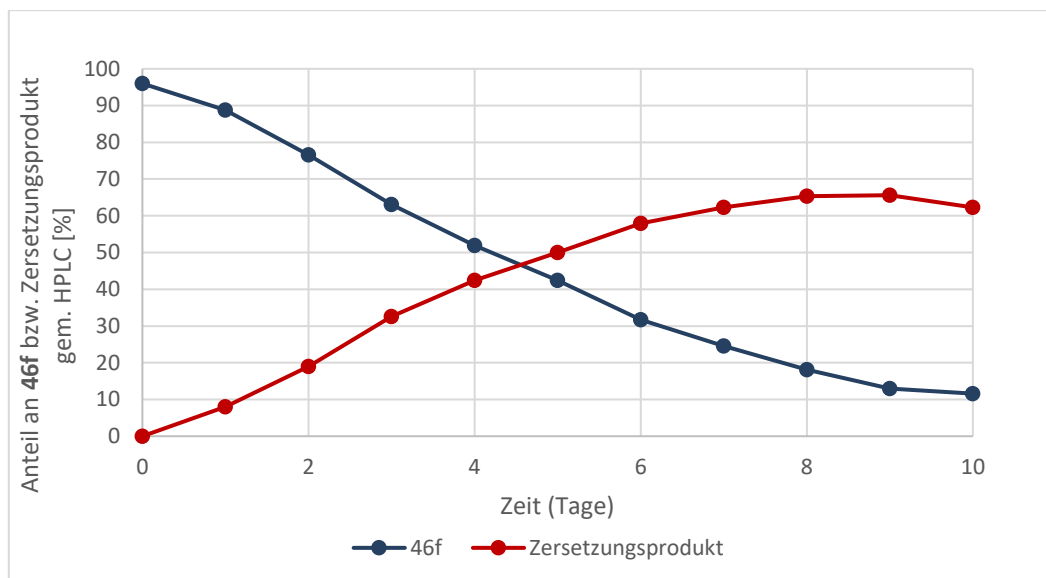


Abbildung 5-2: Stabilitätsuntersuchung von **46f** unter Lichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 366 nm in einem DMSO/Wasser-Gemisch bei Raumtemperatur. Dabei wurde der Anteil des sich bildenden Zersetzungsprodukts mit der HPLC (System 3) ermittelt.

6 Biologische Aktivität

Die biologischen Testungen der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47** wurden von Dr. Arne Alder unter der Leitung von Prof. Dr. Tim W. Gilberger am *Centre for Structural Systems Biology* in Hamburg durchgeführt.

Hierzu wurden Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten bei drei verschiedenen Konzentrationen (30 μ M, 3 μ M und 0.3 μ M) durchgeführt. Für besonders aktive Verbindungen wurden zusätzlich IC_{50} -Werte bestimmt. Außerdem wurde die Zytotoxizität anhand von Viabilitätsuntersuchungen an HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney*) bei 30 μ M ermittelt. Die inhibitorische Aktivität an der rekombinanten *Pf*GSK-3 wurde für alle 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide bei 10 μ M bestimmt. Zusätzlich wurde für bestimmte Verbindungen die inhibitorische Aktivität an der rekombinanten *Hs*GSK-3 bei 10 μ M bestimmt. Eine Übersicht über die Ergebnisse sämtlicher biologischer Assays sind in Tabelle 10-23, Tabelle 10-24 und Tabelle 10-25 aufgeführt. Auffälligkeiten bestimmter Verbindungen und Struktur-Aktivitätsbeziehungen werden im Folgenden diskutiert.

Zur Übersichtlichkeit werden nachfolgend die modifizierten Positionen mit **A**, **B** und **C** bezeichnet.

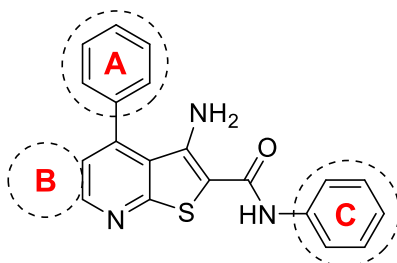


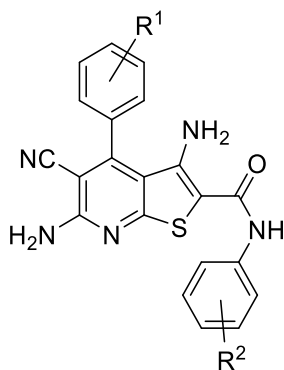
Abbildung 6-1: Übersicht der modifizierten Positionen der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide.

6.1 Modifikation der Strukturelemente A und C

Durch die Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten der Verbindungen **47a** – **47i** sollte der Einfluss des Substitutionsmusters an den aromatischen Ringen **A** und **C** untersucht werden. In Position **B** befand sich bei diesen Verbindungen eine 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur. Dabei wurde für eine Methylgruppe in der *meta*-Position von **A** eine gute antiplasmodiale Aktivität detektiert (vgl. **47e**). Ein Fluor-Substituent in dieser Position weist eine geringere Aktivität auf (vgl. **47h**). Für den Chlor-Substituenten wie in **47a** wurden mittlere antiproliferative Werte erhalten. Ein lipophiler, schwach elektronenschiebender Substituent, wie die Methylgruppe, scheint hier den lipophilen, schwach elektronenziehenden Substituenten, wie den Halogenen, überlegen zu sein.

Daneben wurde für die Substitution des Anilid-Aromaten **C** für einen *ortho*-Chlor-Substituenten ein Aktivitätsverlust festgestellt. Eine *para*-Chlor-Substitution wird allerdings toleriert. Dies wird beim Vergleich von **47b**, **47c** und **47f** zu **47a**, **47e** und **47h** deutlich. Eine *ortho*-Chlor-Substitution führt zu einer sterischen Hinderung im Vergleich zu einem *meta*- oder *para*-substituierten Aromaten. Hierdurch weisen diese Verbindungen eine andere Konformation auf als Verbindungen, die *meta*- oder *para*-substituiert sind. Außerdem weist ein *para*-Chlor-Substituent an Ring **C** gering bessere Aktivitätswerte auf als ein Fluor-Substituent (**47a**, **47e** und **47h** vs. **47d**, **47g**, **47i**) (Tabelle 6-1).

Tabelle 6-1: Parasitämie der mit *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten bei einer Konzentration von 0.3 μ M, 3 μ M und 30 μ M der Verbindungen **47a-47i**.



Verbindung	R ¹	R ²	Parasitämie von 3D7 bei		
			30 μ M [%]	3 μ M [%]	0.3 μ M [%]
47a	3-Cl	4-Cl	1.3 \pm 1.9	3.7 \pm 3.6	23.1 \pm 10.8
47b	3-F	2-Cl	17.4 \pm 24.9	46.0 \pm 19.7	96.0 \pm 1.9
47c	3-Cl	2-Cl	4.2 \pm 2.1	40.0 \pm 15.9	69.2 \pm 26.0
47d	3-Cl	4-F	2.2 \pm 2.8	3.5 \pm 3.5	88.5 \pm 17.6
47e	3-Me	4-Cl	2.8 \pm 2.7	5.6 \pm 5.5	9.7 \pm 6.8
47f	3-Me	2-Cl	4.7 \pm 4.2	51.6 \pm 15.7	80.2 \pm 20.3
47g	3-Me	4-F	3.3 \pm 3.1	3.1 \pm 2.7	63.8 \pm 16.5
47h	3-F	4-Cl	3.0 \pm 3.0	3.9 \pm 2.9	63.2 \pm 19.5
47i	3-F	4-F	3.3 \pm 2.0	6.1 \pm 4.9	65.8 \pm 24.6

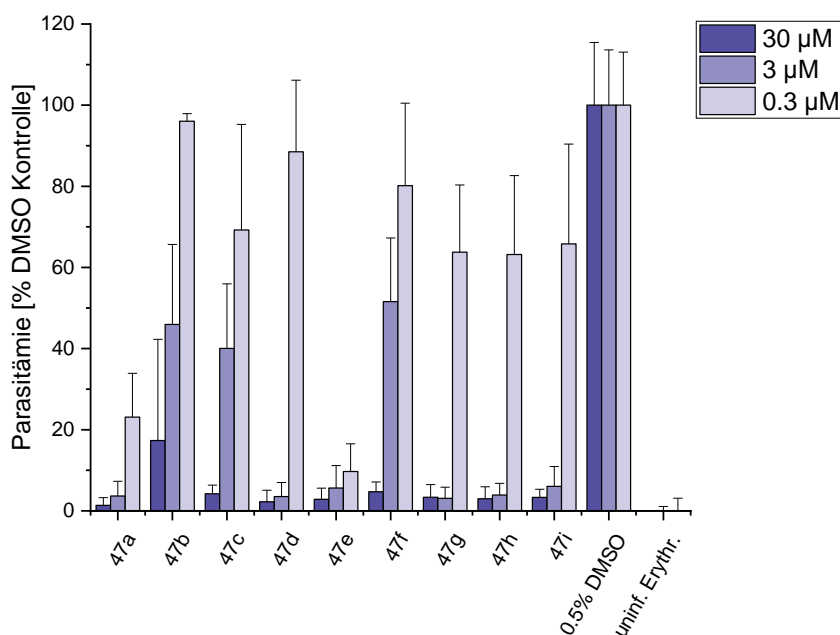


Abbildung 6-2: Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten unter Zusatz der Verbindungen **47a-47i** bei einer Konzentration von 30 µM, 3 µM und 0.3 µM.

In Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden mit Ausnahme von **47i** ein über 50%iges Überleben der HEK293T-Zellen bei einer Konzentration der Verbindungen von 30 µM nachgewiesen (Abbildung 6-3, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25). Dementsprechend sind diese Verbindungen als nicht toxisch einzustufen.

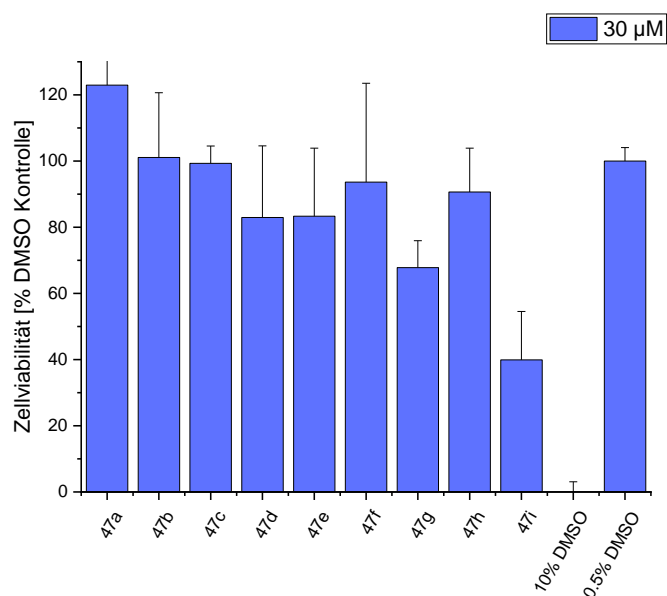


Abbildung 6-3: Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen **47a-47i** bei einer Konzentration von 30 µM an HEK293T-Zellen.

Eine Hemmung der *Pf*GSK-3 wurde für **47a-47i** nicht detektiert. Auch eine *Hs*GSK-3-Inhibition wurde beispielhaft für **47a** und **47e** ausgeschlossen (Abbildung 6-4, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25). Die antiparasitäre Wirkung der Verbindungen wird folglich nicht durch eine *Pf*GSK-3-Inhibition hervorgerufen.

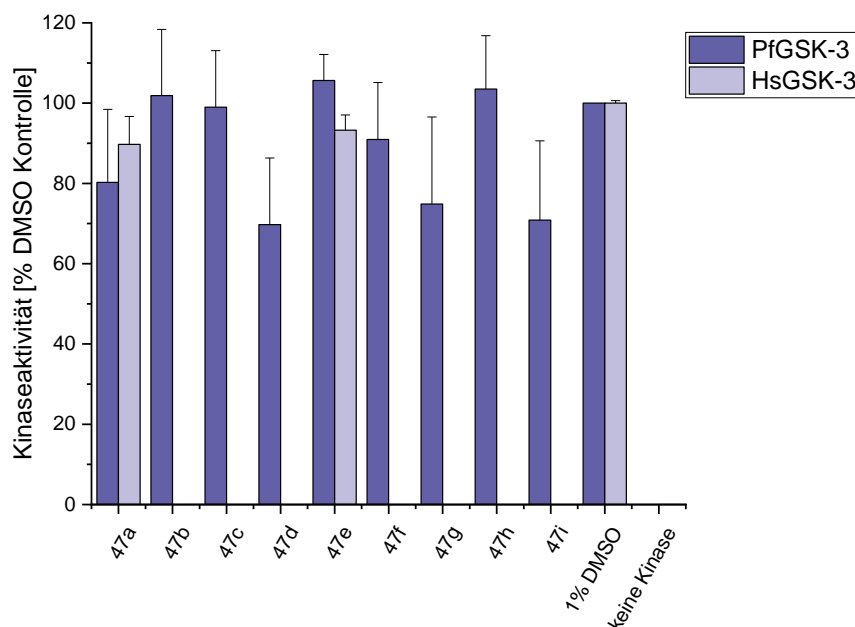
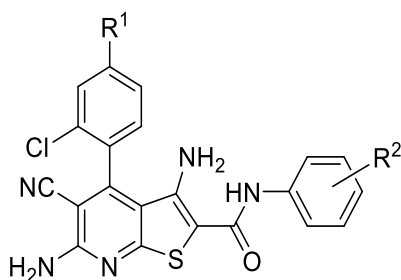


Abbildung 6-4: Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen **47a-47i** bei einer Konzentration von 10 μ M an der *Pf*GSK-3 und der *Hs*GSK-3.

6.2 Modifikation an 4-Position des Rings A und durch Halogensubstituenten an Ring C

Darüber hinaus wurde in Position **A** der Einfluss basischer Strukturelemente in Verbindung mit verschiedenen Halogen-substituierten Aromaten in Position **C** betrachtet. In Position **B** weisen die folgenden Verbindungen erneut eine 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur auf. Am Beispiel von **47u**, **47v** und **47ae** fällt auch hier die geringere Aktivität der *ortho*-Chlor-substituierten Aromaten in Position **C** auf. Ein *meta*- oder *para*-substituierter Aromat wurde hingegen toleriert. Für den 4-Chlor-Substituenten wurde erneut überwiegend eine geringfügig höhere antiplasmodiale Aktivität detektiert als für den kleineren 4-Fluor-Substituenten (**47w** und **47z** vs. **47y** und **47ad**, Tabelle 6-2).

Basische Strukturelemente in 4-Position des Rings **A**, die die Löslichkeit verbessern sollten, wurden toleriert. Dabei waren lediglich geringe Unterschiede zwischen den Substituenten auszumachen, die keine klaren Schlussfolgerungen im Sinne von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zulassen. Die Verbindungen **47r** und **47af** stellen neben **47ag** hoch aktive Verbindungen dar (Tabelle 6-2).

Tabelle 6-2: Parasitämie von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten nach Zugabe von **47q** - **47ag**.


Verbindung	R ¹	R ²	Parasitämie von 3D7 bei		
			30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]
47q	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	3-Cl	3.1 ± 2.4	5.4 ± 3.2	48.3 ± 18.0
47r	Piperazino- als Hydrochlorid	3-Cl	2.5 ± 3.2	4.9 ± 3.0	6.5 ± 3.1
47s	Morpholino-	3-Cl	3.0 ± 1.7	2.8 ± 3.6	45.7 ± 17.2
47t	Pyrrolidino-	3-Cl	4.0 ± 4.6	4.8 ± 5.0	78.3 ± 15.2
47u	Pyrrolidino-	2-Cl	5.1 ± 3.2	60.6 ± 23.7	68.9 ± 27.3
47v	Morpholino-	2-Cl	3.5 ± 1.4	53.1 ± 29.6	74.5 ± 21.2
47w	Morpholino-	4-Cl	2.2 ± 1.5	6.2 ± 6.1	51.8 ± 38.6
47x	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Aminoethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino-	3-Cl	5.8 ± 4.5	3.6 ± 2.4	50.1 ± 37.9
47y	Morpholino-	4-F	4.2 ± 3.8	8.7 ± 6.6	59.0 ± 43.6
47z	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Aminoethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-Cl	3.2 ± 1.1	5.5 ± 4.6	36.6 ± 27.4
47aa	Pyrrolidino-	4-Cl	2.5 ± 1.8	6.4 ± 5.8	73.1 ± 22.1
47ab	Pyrrolidino-	4-F	2.6 ± 1.8	5.3 ± 2.6	61.8 ± 27.7
47ac	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-F	3.5 ± 9.2	8.2 ± 10.4	26.8 ± 19.5
47ad	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Aminoethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-F	3.3 ± 0.9	7.5 ± 5.9	30.1 ± 14.2
47ae	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Aminoethyl)]- <i>N</i> -(methyl)amino-	2-Cl	3.9 ± 0.8	13.3 ± 9.9	57.7 ± 24.1
47af	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino- als Hydrochlorid	3-Cl	2.6 ± 2.9	7.6 ± 7.5	5.8 ± 4.2
47ag	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino-	3-Cl	3.7 ± 6.1	5.4 ± 6.7	5.6 ± 4.7

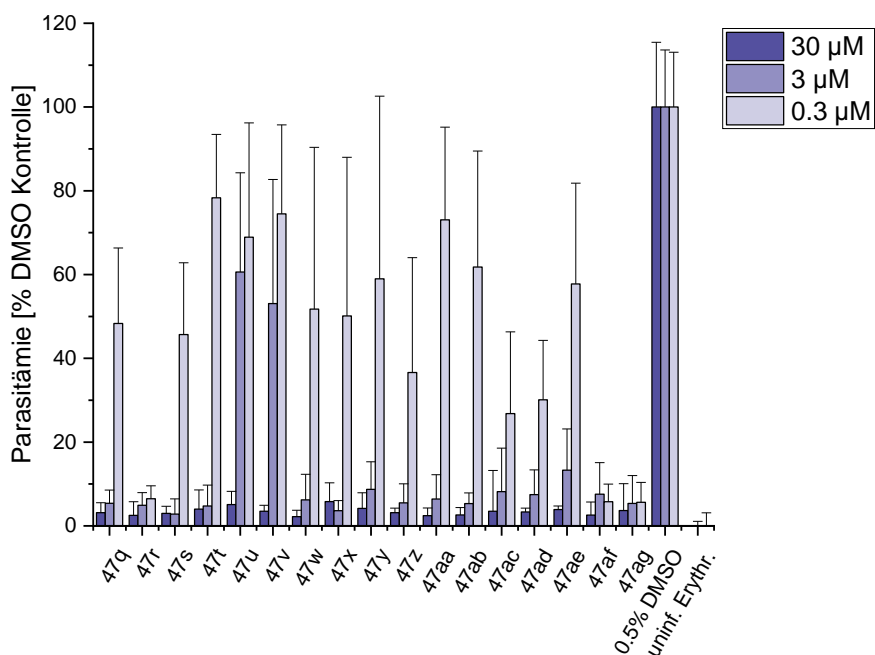


Abbildung 6-5: Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen **47q-47ag** bei einer Konzentration von 30 µM, 3 µM und 0.3 µM.

47r, **47ac**, **47af** und **47ag** weisen neben der hohen antiproliferativen Aktivität auch stark zytotoxische Eigenschaften auf und eignen sich somit nicht als potenzielle Entwicklungskandidaten. Diese Zytotoxizität wurde bei den weiteren Verbindungen nicht wiedergefunden (Abbildung 6-6, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

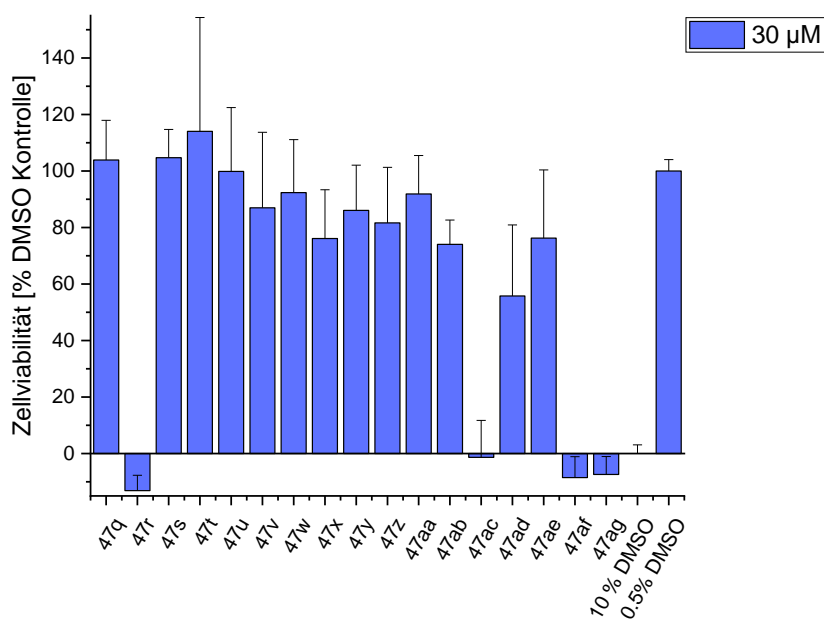


Abbildung 6-6: Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen **47q-47ag** bei einer Konzentration von 30 µM an HEK293T-Zellen.

Eine Hemmung der *Pf*GSK-3 durch die Verbindungen **47q-47ag** wurde nicht detektiert. Auch eine *Hs*GSK-3-Inhibition wurde für **47w**, **47x** und **47z** nicht ermittelt (Abbildung 6-7, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

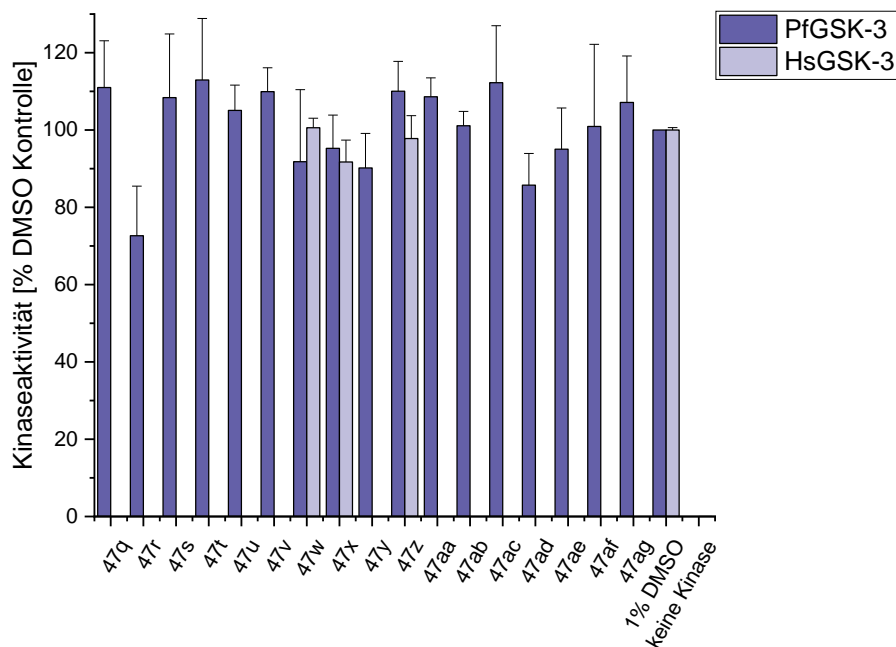
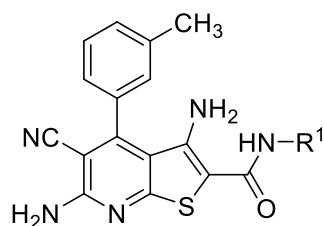


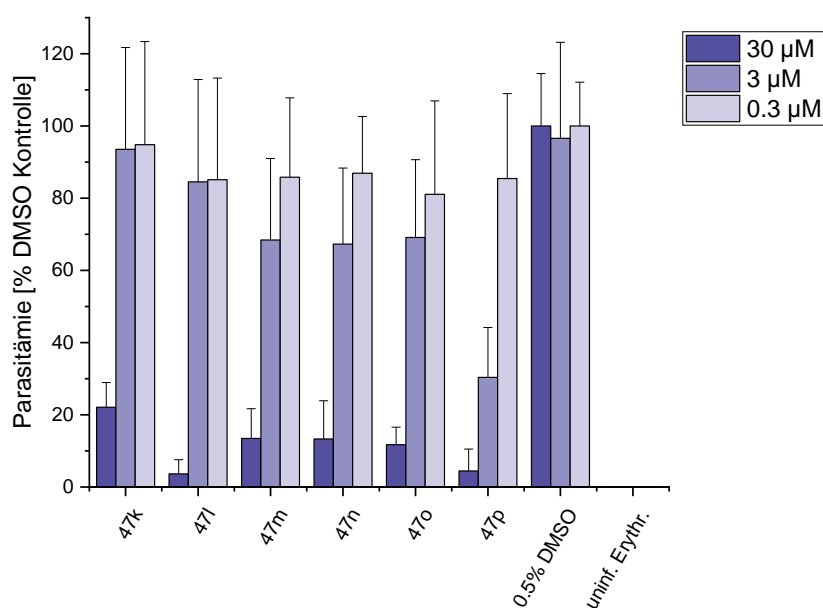
Abbildung 6-7: Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen **47q-47ag** bei einer Konzentration von 10 μ M an der *Pf*GSK-3 und der *Hs*GSK-3.

6.3 Modifikation der Region C

Mit Hilfe der Verbindungen **47k-47p** wurde der Einfluss des Amid-Substituenten **C** untersucht. Die *meta*-Methylgruppe an Ring **A** sowie die 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur in Position **B** wurden aufgrund der detektierten antiproliferativen Wirkung der bisherigen Verbindungen übernommen. Der aromatische Anilid-Substituent **C** wurde gegen aliphatische Reste ausgetauscht. Dabei wurde ein relativer Verlust der antiproliferativen Wirkung festgestellt. Der überwiegende Teil dieser Vertreter (**47k-47o**) hemmt bei einer Konzentration von 3 μ M die Parasitämie in den untersuchten Erythrozytenkulturen um weniger als 50%. Lediglich **47p** wurde mit einem Inhibitionswert von 70% noch als relativ potent identifiziert. Auch diese Verbindung ist jedoch wesentlich schwächer als das Analogon **47e**, das am Amid-Stickstoffatom den aromatischen 4-Chlorsubstituenten trägt und bei derselben Konzentration die Parasitämie um mehr als 90% hemmt (Tabelle 6-3).

Tabelle 6-3: Parasitämie von *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten nach Zugabe von **47e** und **47k-47p**.


Verbindung	R ¹	Parasitämie von 3D7 bei		
		30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]
47e	4-Cl-Ph	2.8 ± 2.7	5.6 ± 5.5	9.7 ± 6.8
47k	Methyl-	22.1 ± 6.4	93.5 ± 28.2	94.8 ± 28.6
47l	Heptyl-	3.6 ± 3.7	84.5 ± 28.4	85.1 ± 28.2
47m	Isopropyl-	13.4 ± 7.8	68.4 ± 22.6	85.8 ± 22.0
47n	Cyclopropyl-	13.3 ± 10.0	67.3 ± 21.1	86.9 ± 15.7
47o	<i>N</i> -(2-Morpholinoethyl)-	11.7 ± 4.6	69.1 ± 21.5	81.1 ± 25.9
47p	<i>N</i> -(2-Cyclopropylethyl)-	4.5 ± 5.7	30.4 ± 13.8	85.4 ± 23.5


 Abbildung 6-8: Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen **47k-47p** bei einer Konzentration von 30 µM, 3 µM und 0.3 µM.

Für **47k-47o** wurde keine Einschränkung der Zellviabilität von unter 50% bei einer Konzentration der Verbindungen von 30 μM detektiert. Folglich werden diese Verbindungen als nicht toxisch eingestuft. Lediglich **47p** wies eine gering verbleibende Zellviabilität von etwa 25% nach Zugabe von 30 μM dieser Verbindung auf (Abbildung 6-9, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

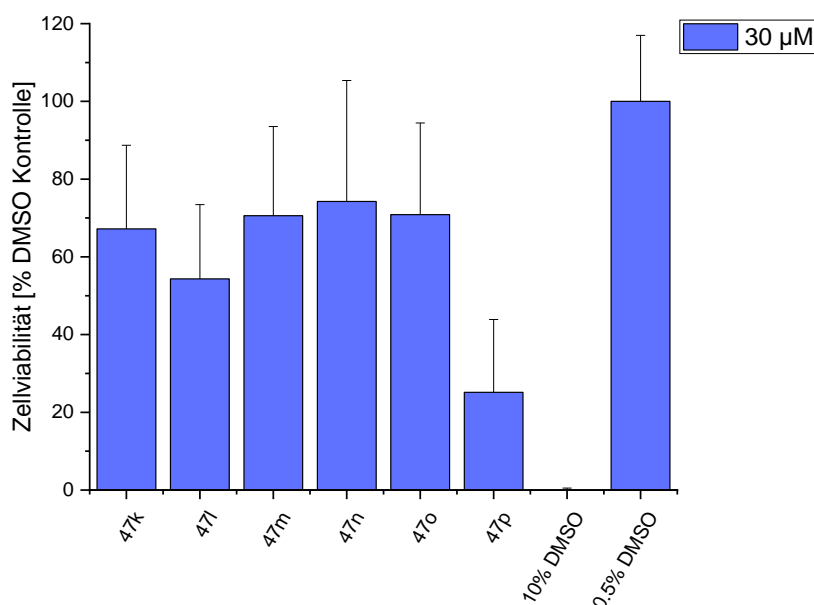


Abbildung 6-9: Zytotoxizitätsassay mit den Verbindungen **47k-47p** bei einer Konzentration von 30 μM an HEK293T-Zellen.

Durch Kinase-Assays an der *PfGSK-3* wurde für **47k**, **47n** und **47o** eine Inhibition der *PfGSK-3* zu über 40% gegenüber der Kontrolle ermittelt. Dies ist schlüssig, da **47k** und **47n** in der molekularen Region der Amidgruppe am wenigsten raumfüllend sind und so den *PfGSK-3*-inhibierenden Analoga von FUGEL *et al.*¹⁷⁴ am stärksten ähneln. Bereits in den beschriebenen *docking*-Studien wurde eine Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen **47k** und der ATP-Bindetasche der *PfGSK-3* vorhergesagt (Abschnitt 3). Eine Inhibition der *HsGSK-3* wurde dahingegen für **47k** und **47m-47o** nicht beobachtet (Abbildung 6-10, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

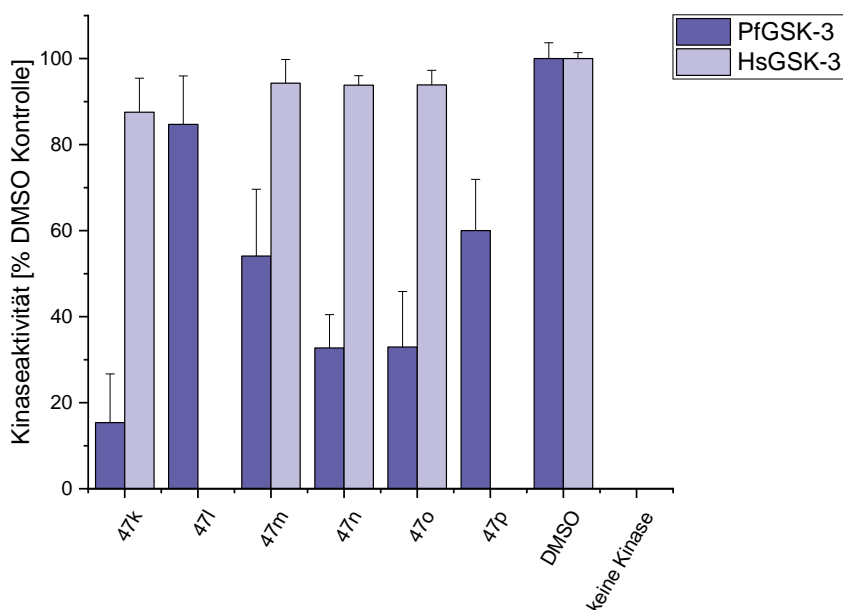


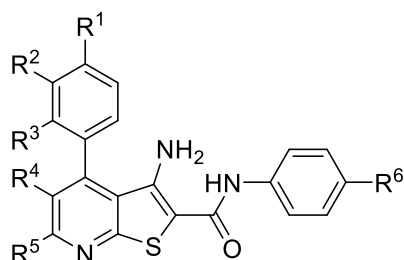
Abbildung 6-10: Kinase-Aktivitäts-Assay mit den Verbindungen **47k-47p** bei einer Konzentration von 10 μ M an der PfGSK-3 und der HsGSK-3.

6.4 Variation in Region B

Aufgrund der guten antiplasmodialen Aktivität der Verbindungen mit einem 4-Chlor-Substituenten am Aromaten **C** wurde dieser Substituent für die folgenden Verbindungen übernommen. Durch **46a-46l** sollte die Notwendigkeit des 3-Methyl-Substituenten am Ring **A** und der Einfluss der 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur der Region **B** evaluiert werden (Tabelle 6-4).

Hierzu wurde der Ring **A** sowohl mit großen stickstoffhaltigen Substituenten versehen als auch entsprechende Verbindungen ohne Substituenten untersucht. Für einen besseren Vergleich dieser Derivate wurden zusätzlich 3-Methyl-substituierte Verbindungen dargestellt. In Bereich **B** wurden neben aliphatischen Strukturelementen, wie Cyclohexa- oder Cyclopenta-Anellanden auch eine Methyl-Gruppe und *tert*-Butyl geschützte-Ester-Strukturen bzw. ihre freien Säuren untersucht.

Dabei wurden gute antiplasmodiale Aktivitäten sowohl für die Ester-substituierten Verbindungen **46g-46h**, als auch für die aliphatischen Cyclohexyl- bzw. Cyclopentyl-anellierten Verbindungen **46d-46e** bzw. **46b**, **46c** und **46f** detektiert. Carbonsäure-Funktionen wie in **46i-46j** scheinen weniger günstig für die antiplasmodiale Aktivität zu sein. Am Ring **A** werden große stickstoffhaltige Substituenten toleriert. Allerdings weisen Verbindungen mit *meta*-Methyl-Gruppen am Ring **A** oder mit an dieser Stelle unsubstituierten Phenylringen überwiegend eine stärkere antiproliferative Aktivität auf (Tabelle 6-4, Tabelle 6-5, Tabelle 6-6, Tabelle 6-7).

Tabelle 6-4: Substitutionsmuster der Verbindungen **46a** - **46l**.


Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
46a	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46b	H	H	H	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46c	H	H	H	-(CH ₂) ₃ -		F
46d	H	H	H	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46e	H	Methyl-	H	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46f	H	Methyl-	H	-(CH ₂) ₃ -		Cl
46g	H	H	H	(H ₃ C) ₃ COOC-	Methyl-	Cl
46h	H	Methyl-	H	(H ₃ C) ₃ COOC-	Methyl-	Cl
46i	H	Methyl-	H	COOH	Methyl-	Cl
46j	H	H	H	COOH	Methyl-	Cl
46k	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	-(CH ₂) ₄ -		Cl
46l	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	H	Methyl-	Cl

 Tabelle 6-5: Parasitämie (*P. falciparum* 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit **46a**-**46l**.

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei		
	30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]
46a	11.0 ± 11.1	13.9 ± 9.9	71.9 ± 26.3
46b	3.4 ± 5.6	9.9 ± 13.7	14.0 ± 11.3
46c	3.1 ± 4.9	17.9 ± 15.1	29.5 ± 16.5
46d	1.6 ± 3.4	15.5 ± 17.4	9.2 ± 5.7
46e	8.0 ± 8.3	10.0 ± 12.9	11.5 ± 11.6
46f	9.1 ± 11.4	8.0 ± 12.9	14.6 ± 16.1
46g	9.0 ± 9.6	12.9 ± 14.6	11.0 ± 10.1
46h	7.3 ± 9.0	8.7 ± 13.5	14.1 ± 12.3
46i	3.1 ± 2.6	51.9 ± 21.0	98.2 ± 18.8

Tabelle 6-6: Parasitämie (*P. falciparum* 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit **46a-46l** (Fortsetzung).

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei		
	30 μ M [%]	3 μ M [%]	0.3 μ M [%]
46j	5.0 \pm 5.9	88.6 \pm 21.7	90.5 \pm 23.1
46k	6.3 \pm 6.6	11.2 \pm 8.9	51.4 \pm 24.9
46l	3.9 \pm 2.3	6.0 \pm 6.9	17.8 \pm 14.4

Tabelle 6-7: Parasitämie (*P. falciparum* 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit **46a-46l**.

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei		
	30 μ M [%]	3 μ M [%]	0.3 μ M [%]
46a	11.0 \pm 11.1	13.9 \pm 9.9	71.9 \pm 26.3
46b	3.4 \pm 5.6	9.9 \pm 13.7	14.0 \pm 11.3
46c	3.1 \pm 4.9	17.9 \pm 15.1	29.5 \pm 16.5
46d	1.6 \pm 3.4	15.5 \pm 17.4	9.2 \pm 5.7
46e	8.0 \pm 8.3	10.0 \pm 12.9	11.5 \pm 11.6
46f	9.1 \pm 11.4	8.0 \pm 12.9	14.6 \pm 16.1
46g	9.0 \pm 9.6	12.9 \pm 14.6	11.0 \pm 10.1
46h	7.3 \pm 9.0	8.7 \pm 13.5	14.1 \pm 12.3
46i	3.1 \pm 2.6	51.9 \pm 21.0	98.2 \pm 18.8
46j	5.0 \pm 5.9	88.6 \pm 21.7	90.5 \pm 23.1
46k	6.3 \pm 6.6	11.2 \pm 8.9	51.4 \pm 24.9
46l	3.9 \pm 2.3	6.0 \pm 6.9	17.8 \pm 14.4

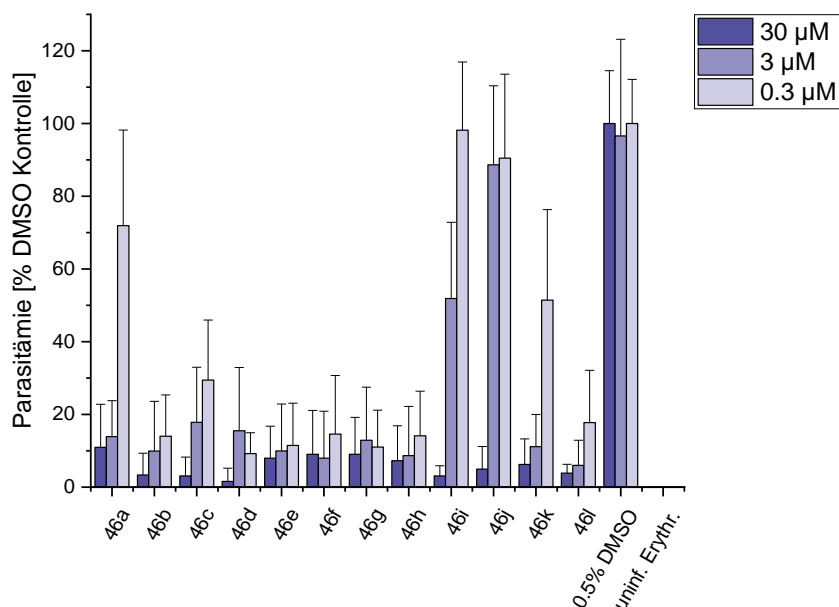


Abbildung 6-11: Proliferationsassays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen **46a-46l** bei 30 µM, 3 µM und 0.3 µM.

In Zytotoxizitätsassays an HEK293T-Zellen wurde für die Verbindungen **46d** und **46h** bei einer Konzentration von 30 µM eine Hemmung der Viabilität von über 50% festgestellt. Auch die Verbindungen **46e** und **46g** weisen mit einer Zellviabilität von knapp über 50% relativ zu den Kontrollen keine optimale Selektivität gegenüber den Parasiten auf (Abbildung 6-12, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

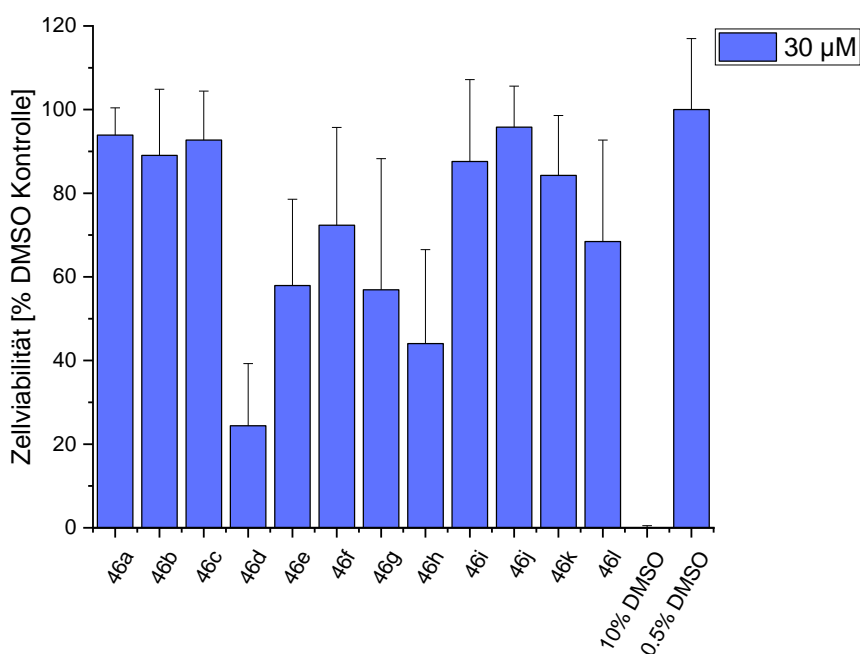


Abbildung 6-12: Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen **46a-46l** bei einer Konzentration von 30 µM an HEK293T-Zellen.

Eine Inhibition der *Pf*GSK-3 bzw. der *Hs*GSK-3 konnte abermals für keine dieser Verbindungen detektiert werden (Abbildung 6-13, Tabelle 10-23, Tabelle 10-24, Tabelle 10-25).

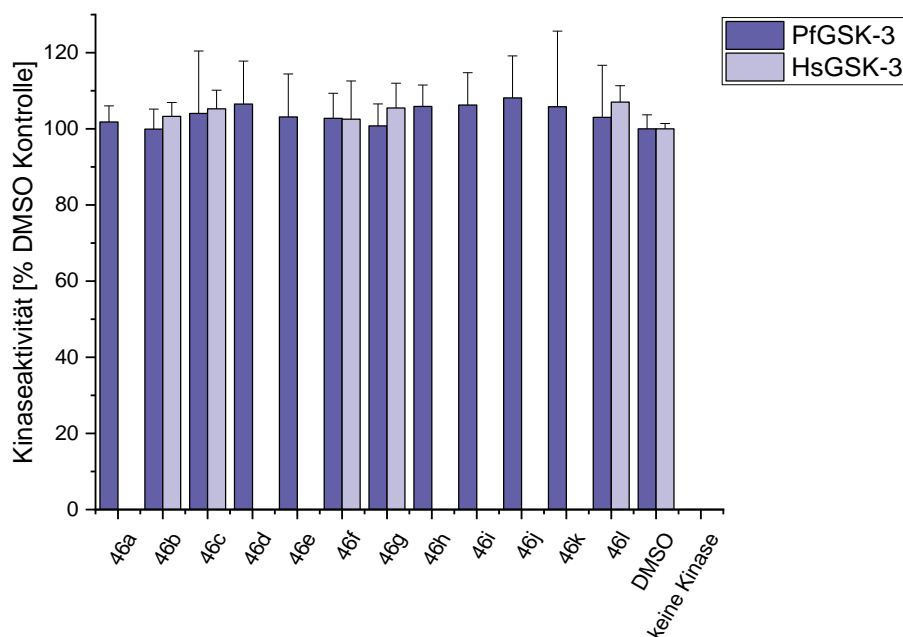


Abbildung 6-13: Ergebnisse der Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen **46a-46l** bei einer Konzentration von 10 μ M an der *Pf*GSK-3 und der *Hs*GSK-3.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass lediglich bei den Verbindungen **47k**, **47n** und **47o** bei einer Konzentration von 10 μ M eine Inhibition der *Pf*GSK-3 über 50% detektiert wurde. Dies wurde anhand von *docking*-Studien bereits vorausgesagt (Abschnitt 3). Die *Hs*GSK-3 wurde in den durchgeführten Assays von keiner Verbindung gehemmt. Es wurde jedoch eine starke antiplasmodiale Wirkung bei Assays an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten nachgewiesen. Dies lässt auf einen neuartigen Wirkmechanismus schließen. Von zehn ausgewählten Derivaten wurden die IC_{50} -Werte der antiparasitären Aktivität in entsprechenden Testverfahren bestimmt. Dabei konnte **46f** als aktivste Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von 19.2 nM identifiziert werden.

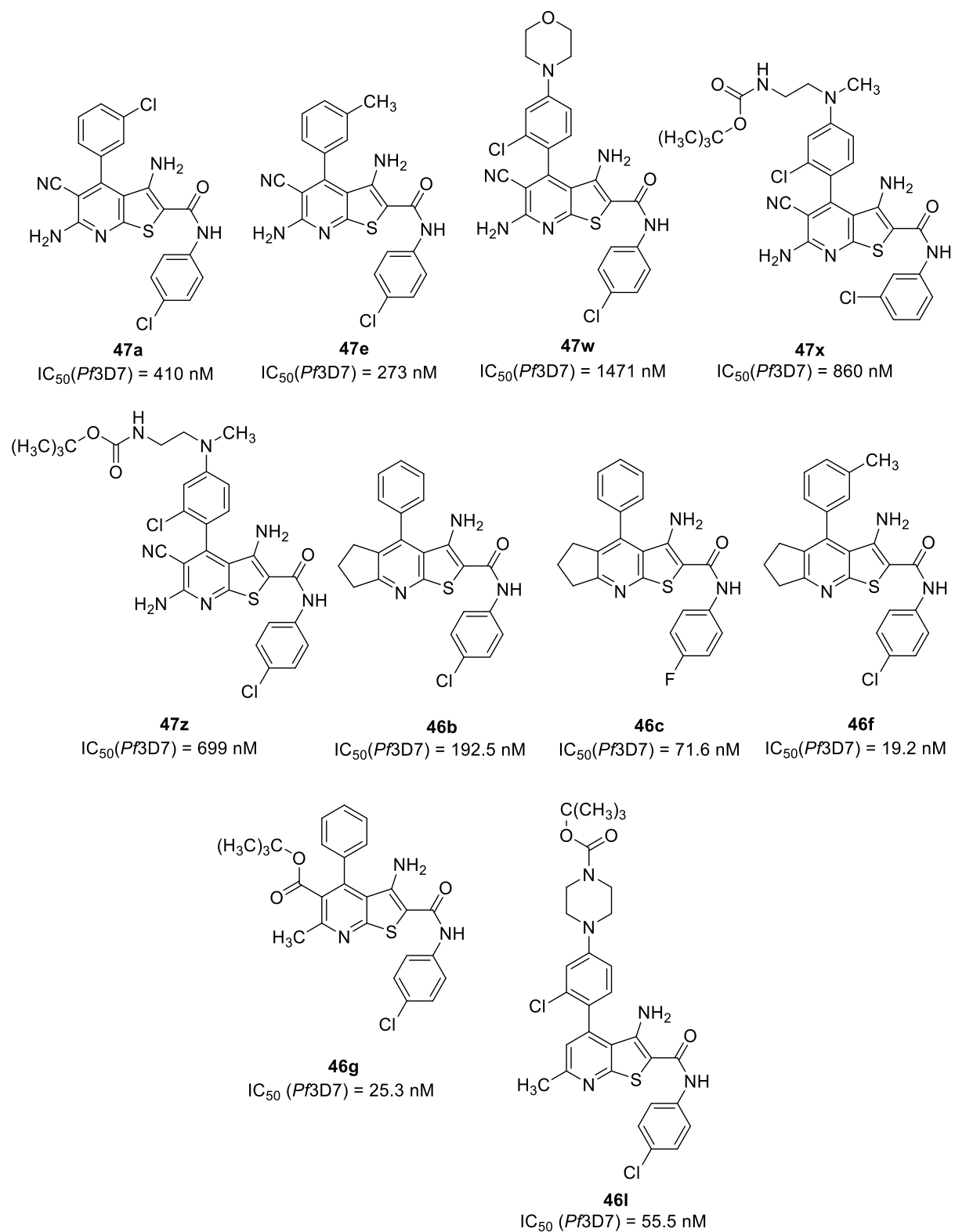


Abbildung 6-14: Verbindungen, für die ein IC_{50} -Wert an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten ermittelt wurde.

7 Physikochemische Eigenschaften

Zur Beurteilung der physikochemischen Eigenschaften wurden von den 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid-Derivaten **47a-47ag** und **46a-46l** die unter Abschnitt 1.8 erläuterten Parameter der $Ro5^{237}$ sowie die nach VEBER *et al.*²⁴² geforderten Kenngrößen bestimmt. Anstelle der aufwendig zu ermittelnden PSA wurde die gut korrelierende, jedoch leichter zu ermittelnde *topological* PSA (TPSA) nach ERTL *et al.* verwendet.²⁴³ Zusätzlich wurde die Anzahl an Aromaten (Ar) bestimmt. Nach RITCHIE und MACDONALD sollte diese ≤ 3 liegen, um eine ausreichende Löslichkeit potenzieller Wirkstoffkandidaten zu gewährleisten.²⁶⁰ Eine erhöhte Anzahl an Aromaten vermindert aufgrund der erhöhten Starrheit der Moleküle sowie einer erhöhten Gitterenergie in Folge von π - π -Wechselwirkungen die Löslichkeit. Darüber hinaus nimmt mit steigender Aromatenanzahl die Lipophilie zu.²⁶⁰

Nach LOVERING *et al.* korreliert außerdem der Anteil sp^3 -hybridisierter Kohlenstoffatome, ausgedrückt als Fraktion sp^3 -hybridisierter Kohlenstoffe in Relation zur Anzahl der Gesamt-Kohlenstoffe (F_{sp^3}), sowohl mit der Löslichkeit als auch mit dem Schmelzpunkt. So kann eine erhöhte F_{sp^3} zu einer verbesserten Löslichkeit sowie zu einem niedrigeren Schmelzpunkt führen.³²⁵ Die F_{sp^3} wurde ebenfalls für die dargestellten Thieno[2,3-*b*]pyridincarbamide ermittelt. Der ermittelte Schmelzpunkt korreliert außerdem mit der Löslichkeit, sodass auch dieser hier angegeben wird.²⁵³

Der clogP-Wert wurde mit MarvinSketch³²⁶ bestimmt. Je nach verwendetem Programm ergeben sich teilweise stark variierende clogP-Werte, sodass ein Vergleich dieses Parameters nur bei Verwendung desselben Programms erfolgen sollte. Die weiteren Parameter wurden mit SwissADME³²⁷ vorhergesagt. Mit Ausnahme des Schmelzpunkts bieten diese Kenngrößen den Vorteil, dass bereits vor der Synthese eine Abschätzung der physikochemischen Eigenschaften erfolgen kann. Für **47a**, **47e**, **47w**, **47x**, **47z**, **46b**, **46c**, **46f**, **46g** und **46l** wurden außerdem die LE- und LLE-Werte berechnet, die im Gegensatz zu den o.g. Parametern erst nach erfolgter Synthese und biologischer Testung generiert werden können. Die Einordnung der physikochemischen Eigenschaften der synthetisierten Endprodukte **47a-47ag** sowie **46a-46l** wird im Folgenden erläutert.

Bei den 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid-**47a-47i** wurde der Phenylring in 4-Position sowie der aromatische Anilidrest durch Methylgruppen oder Halogene modifiziert. Die Verbindungen erfüllen mit Ausnahme von **47i** nicht die $Ro5^{237}$, da der clogP-Wert jeweils über fünf liegt. Auch die TPSA von über 140 \AA^2 liegt über den von VEBER *et al.*²⁴² geforderten Grenzwert. Statt der TPSA kann jedoch die Summe der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren (HBA/HBD) betrachtet werden, die maximal zwölf betragen sollte. In Verbindung mit der Anzahl an rotierbaren Bindungen, die bei den Verbindungen mit vier deutlich unter der Grenze von zehn liegt, werden die von VEBER *et al.*²⁴² geforderten Bedingungen erfüllt.

Die Anzahl an Aromaten ist jedoch mit vier über der von RITCHIE und MACDONALD²⁶⁰ empfohlenen Grenze. Auch die Fraktion sp^3 -hybridisierter Kohlenstoffe ist mit Ausnahme von **47e**, **47f** und **47g** mit einem Wert von null sehr gering (Tabelle 7-1, Tabelle 7-2). Insgesamt zeigen diese Verbindungen dementsprechend suboptimale physikochemische Eigenschaften auf, weshalb u.a. basische oder aliphatische Teilstrukturen eingebracht werden sollten.

Tabelle 7-1: Strukturmodifikationen der Verbindungen **47a-7i**.

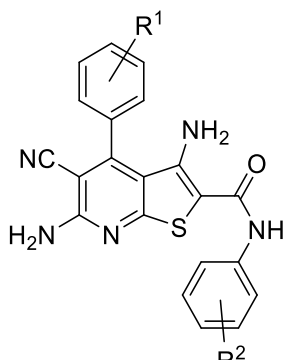
	Verbindung	R ¹	R ²
	47a	3-Cl	4-Cl
	47b	3-F	2-Cl
	47c	3-Cl	2-Cl
	47d	3-Cl	4-F
	47e	3-Me	4-Cl
	47f	3-Me	2-Cl
	47g	3-Me	4-F
	47h	3-F	4-Cl
	47i	3-F	4-F

Tabelle 7-2: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **47a-7i**.

Verbindung	M _r [g/mol] ^a	clogP ^b	HBA/HBD ^a	RB ^a	TPSA [Å ²] ^a	Ar	Fsp ^{3 a}	MP ^c
47a	454.33	5.44	3/3	4	146.06	4	0.00	280
47b	437.88	5.06	4/3	4	146.06	4	0.00	255
47c	454.33	5.44	3/3	4	146.06	4	0.00	258
47d	437.88	5.06	4/3	4	146.06	4	0.00	250
47e	433.91	5.39	3/3	4	146.06	4	0.05	255
47f	433.91	5.39	3/3	4	146.06	4	0.05	218
47g	417.46	5.01	4/3	4	146.06	4	0.05	255
47h	437.88	5.06	4/3	4	146.06	4	0.00	255
47i	421.42	4.68	5/3	4	146.06	4	0.00	257

^a Mit SwissADME³²⁷ ermittelt; ^b Mit MarvinSketch³²⁶ ermittelt; ^c Untere Grenze des Schmelzintervalls; HBA/HBD: Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren; RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen; TPSA: *topological polar surface area*; Ar: Anzahl an Aromaten; Fsp³: Fraktion sp^3 -hybridisierter Kohlenstoffatome; MP: Schmelzpunkt.

Die Verbindungen **47k-47p** weisen anstelle des 2-Acetanilidrests aliphatische Substituenten auf. Bei diesen Verbindungen wurden deutlich bessere F_{sp^3} -Werte mit bis zu 0.35 erhalten. Auch die $Ro5^{237}$ wird mit Ausnahme von **47l** erfüllt. **47l** besitzt diesbezüglich lediglich einen zu hohen logP-Wert. Weiterhin erfüllen die Verbindungen die Anforderung von maximal drei Aromaten.²⁶⁰ Allerdings wird der Grenzwert der TPSA von max. 140 Å² erneut überschritten. Bei Betrachtung der Summe der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren (HBA/HBD) in Verbindung mit der Anzahl rotierbarer Bindungen werden jedoch die von VEBER *et al.*²⁴² geforderten Bedingungen erfüllt (Tabelle 7-3, Tabelle 7-4).

 Tabelle 7-3: Strukturmodifikationen der Verbindungen **47k-47p**.

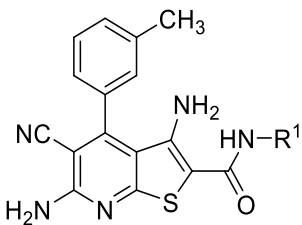
	Verbindung	R ¹
	47k	Methyl-
	47l	Heptyl-
	47m	Isopropyl-
	47n	Cyclopropyl-
	47o	N-(2-Morpholinoethyl)-
	47p	N-(2-Cyclopropylethyl)-

 Tabelle 7-4: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen **47k-47p**.

Verbindung	M _r [g/mol] ^a	clogP ^b	HBA/HBD ^a	RB ^a	TPSA [Å ²] ^a	Ar	Fsp ³ ^a	MP ^c
47k	337.40	2.71	3/3	3	146.06	3	0.12	246
47l	421.56	5.11	3/3	9	146.06	3	0.35	126 ^d
47m	365.45	3.47	3/3	4	146.06	3	0.21	255
47n	363.44	3.11	3/3	4	146.06	3	0.21	241 ^d
47o	436.53	2.35	5/3	6	158.53	3	0.32	246
47p	391.49	3.74	3/3	6	146.06	3	0.29	214

^a Mit SwissADME³²⁷ ermittelt; ^b Mit MarvinSketch³²⁶ ermittelt; ^c Untere Grenze des Schmelzintervalls; HBA/HBD: Summe der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren; RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen; TPSA: *topological polar surface area*; Ar: Anzahl an Aromaten; Fsp³: Fraktion sp³-hybridisierter Kohlenstoffatome; MP: Schmelzpunkt; ^d Mittels DSC ermittelte Schmelzpunkte. Angegeben ist die Onset-Temperatur des letzten Schmelzintervalls.

Bei den in *para*-Position des 4-Phenylrings basisch substituierten Verbindungen **47q-47ag** fällt auf, dass die von LIPINSKI *et al.*²³⁷ geforderte Obergrenze der relativen Molmasse von 500 teilweise deutlich überschritten wird.

Auch die clogP-Werte sind mit Ausnahme von **47r**, **47y** und **47af** größer als fünf. **47r** und **47af** wurden als Hydrochloride dargestellt, wodurch die geringeren clogP-Werte erklärt werden können. Die maximale Anzahl an rotierbaren Bindungen liegt bei **47x**, **47z**, **47ad** und **47ae** über der von VEBER *et al.*²⁴² geforderten Grenze von zehn. Somit entsprechen die Verbindungen weder den geforderten Kriterien nach VEBER *et al.*²⁴², noch der Ro5²³⁷. Auch die Anzahl der Aromaten²⁶⁰ liegt erneut über dem Grenzwert von drei. Allerdings wurde die Fraktion sp³-hybridisierter Kohlenstoffe im Gegensatz zu **47a-47i** verbessert (Tabelle 7-5, Tabelle 7-6). Insgesamt sollten diese Verbindungen jedoch trotz ionisierbarer Teilstrukturen eine schlechte Löslichkeit aufweisen.

 Tabelle 7-5: Strukturmodifikationen der Verbindungen **47q-47ag**.

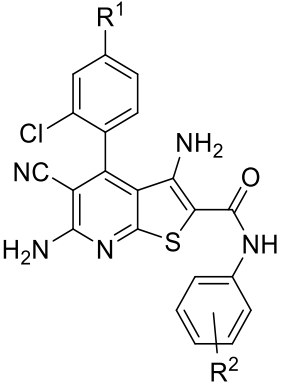
	Verbindung	R ¹	R ²
	47q	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	3-Cl
	47r	Piperazino- (HCl)	3-Cl
	47s	Morpholino-	3-Cl
	47t	Pyrrolidino-	3-Cl
	47u	Pyrrolidino-	2-Cl
	47v	Morpholino-	2-Cl
	47w	Morpholino-	4-Cl
	47x	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl]- <i>N</i> -(methyl)amino-	3-Cl
	47y	Morpholino-	4-F
	47z	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl]- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-Cl
	47aa	Pyrrolidino-	4-Cl
	47ab	Pyrrolidino-	4-F
	47ac	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-F
	47ad	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl]- <i>N</i> -(methyl)amino-	4-F
	47ae	<i>N</i> -[2-(<i>N</i> -Boc-Amino)ethyl]- <i>N</i> -(methyl)amino-	2-Cl
	47af	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino- (HCl)	3-Cl
	47ag	<i>N</i> -(2-Dimethylaminoethyl)- <i>N</i> -(methyl)amino-	3-Cl

Tabelle 7-6: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen **47q-47ag**.

Verbindung	M _r [g/mol] ^a	clogP ^b	HBA/HBD ^a	RB ^a	TPSA [Å ²] ^a	Ar	Fsp ^{3 a}	MP ^c
47q	638.57	6.27	5/3	8	178.84	4	0.27	163
47r	574.91	1.53	3/4	5	165.91	4	0.16	203
47s	539.44	5.36	4/3	5	158.53	4	0.16	253
47t	523.44	6.03	3/3	5	149.30	4	0.16	254
47u	523.44	6.03	3/3	5	149.30	4	0.16	215
47v	539.44	5.36	4/3	5	158.53	4	0.16	197
47w	539.44	5.36	4/3	5	158.53	4	0.16	277
47x	626.56	6.20	5/4	11	187.63	4	0.24	170
47y	522.98	4.98	5/3	5	158.53	4	0.16	267
47z	626.56	6.20	5/4	11	187.63	4	0.24	192
47aa	523.44	6.03	3/3	5	149.30	4	0.16	258
47ab	506.98	5.65	4/3	5	149.30	4	0.16	249
47ac	538.04	5.30	5/3	8	152.54	4	0.19	190
47ad	610.10	5.82	6/4	11	187.63	4	0.24	181
47ae	626.56	6.20	5/4	11	187.63	4	0.24	203
47af	562.90	1.47	4/4	7	175.32	4	0.12	209
47ag	554.49	5.68	4/3	8	152.54	4	0.19	156

^a Mit SwissADME³²⁷ ermittelt; ^b Mit MarvinSketch³²⁶ ermittelt; ^c Untere Grenze des Schmelzintervalls; HBA/HBD: Summe der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren; RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen; TPSA: *topological polar surface area*; Ar: Anzahl an Aromaten; Fsp³: Fraktion sp³-hybridisierter Kohlenstoffatome; MP: Schmelzpunkt.

Dahingegen werden für die in *para*-Position des 4-Phenylrings basisch substituierten Verbindungen in Kombination mit aliphatischen Anellanden anstelle der 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur (vgl. **46a**, **46k** und **46l**) die von VEBER *et al.*²⁴² geforderten Bedingungen erfüllt. Auch das Fsp³-Verhältnis ist mit Werten von bis zu 0.36 akzeptabel. Die Bedingungen der Ro5²³⁷ werden allerdings erneut nicht erfüllt, was einerseits an den sehr großen relativen Molmassen, andererseits an den hohen clogP-Werten von bis zu 7.69 liegt. Die weiteren Verbindungen, bei denen die 6-Amino-5-cyan-Teilstruktur ersetzt wurde, erfüllten dahingegen größtenteils sowohl die von VEBER *et al.*²⁴² als auch die von LIPINSKI *et al.*²³⁷ geforderten Bedingungen. Einzige Ausnahme stellt erneut der clogP-Wert dar, der mit Ausnahme von **46j** erneut über der geforderten Grenze von fünf liegt (vgl. **46b-46g**, **46i-46j**). Insgesamt weisen die Verbindungen eine zu hohe Anzahl an Aromaten auf (Tabelle 7-7, Tabelle 7-8).²⁶⁰

Tabelle 7-7: Strukturmodifikationen der Verbindungen **46a-46l**.

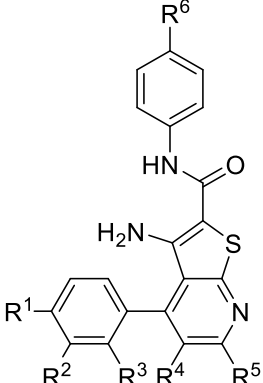
	Verbindung	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
	46a	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	-(CH ₂) ₃ -		Cl
	46b		H	H	-(CH ₂) ₃ -		Cl
	46c		H	H	-(CH ₂) ₃ -		F
	46d		H	H	-(CH ₂) ₄ -		Cl
	46e		H	Me-	-(CH ₂) ₄ -		Cl
	46f		H	Me-	-(CH ₂) ₃ -		Cl
	46g		H	H	(H ₃ C) ₃ COOC-	Me-	Cl
	46h		H	Me-	(H ₃ C) ₃ COOC-	Me-	Cl
	46i		H	Me-	COOH	Me-	Cl
	46j		H	H	COOH	Me-	Cl
	46k	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	-(CH ₂) ₄ -		Cl
	46l	<i>N</i> -Boc-Piperazino-	H	Cl	H	Me-	Cl

 Tabelle 7-8: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen **46a-46l**.

Verbindung	M _r [g/mol] ^a	clogP ^b	HBA/HBD ^a	RB ^a	TPSA [Å ²] ^a	Ar	Fsp ^{3 a}	MP ^c
46a	638.61	7.30	4/2	8	129.03	4	0.34	198
46b	419.93	5.95	2/2	4	96.25	4	0.13	229
46c	403.47	5.57	3/2	4	96.25	4	0.13	252
46d	433.95	6.35	2/2	4	96.25	4	0.17	233
46e	447.98	6.81	2/2	4	96.25	4	0.20	241
46f	433.95	6.42	2/2	4	96.25	4	0.17	240
46g	494.01	6.34	4/2	7	122.55	4	0.19	180
46h	508.03	6.34	4/2	7	122.55	4	0.22	186
46i	451.93	5.34	4/3	5	133.55	4	0.09	237
46j	437.90	4.88	4/3	5	133.55	4	0.05	260
46k	652.63	7.69	4/2	8	129.03	4	0.36	226
46l	612.57	6.71	4/2	8	129.03	4	0.30	238

^a Mit SwissADME³²⁷ ermittelt; ^b Mit MarvinSketch³²⁶ ermittelt; ^c Untere Grenze des Schmelzintervalls; HBA/HBD: Summe der Wasserstoffbrückenakzeptoren und Wasserstoffbrückendonatoren; RB: Anzahl der rotierbaren Bindungen; TPSA: *topological polar surface area*; Ar: Anzahl an Aromaten; Fsp³: Fraktion sp³-hybridisierter Kohlenstoffatome; MP: Schmelzpunkt.

Obwohl viele Verbindungen nach den erläuterten Kriterien suboptimale physikochemische Eigenschaften aufweisen, konnte eine antiproliferative Wirkung an *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten detektiert werden. Diese Parameter sollten dementsprechend nicht gesondert, sondern in Kombination mit ihrer Aktivität zur Bewertung der *druglikeness* betrachtet werden. Als *drug-like* werden Verbindung bezeichnet, wenn sie sowohl ausreichende ADME-Eigenschaften, als auch ein akzeptables Toxizitätsprofil aufweisen, um in der klinischen Studienphase 1 zu bestehen.²⁵⁰ Die Kompositparameter LE und LLE, die zusätzlich die biologische Aktivität mit in Betracht ziehen, werden zur Einordnung der *druglikeness* genutzt. Dabei berücksichtigt der LE-Parameter neben der Aktivität die Molekülgröße, wohingegen die LLE die Lipophilie einbezieht.²⁶⁴ Bei einer LE größer als 0.3 [kcal/mol]/HA^{264,265} bzw. einer LLE größer als fünf²⁴¹ kann von vielversprechenden Entwicklungskandidaten ausgegangen werden.

Für die Verbindungen **46b**, **46c**, **46f**, **46g** und **47e** werden die Anforderungen der LE erfüllt. Die Verbindungen **47a**, **47w**, **47x** und **47z** erfüllen diese jedoch nicht. Sie sind einerseits nicht aktiv genug, andererseits weisen sie auch eine zu große Molekülstruktur auf. Obwohl **46l** vergleichsweise sehr potent ist, kann auch diese Verbindung aufgrund ihrer Molekülgröße gemäß der LE nicht als Entwicklungskandidat empfohlen werden.

Der LLE-Wert stellt die Differenz von Parametern für die biologische Aktivität und die Lipophilie dar. Trotz der guten antiplasmodialen Aktivität der Verbindungen werden die für potenzielle Entwicklungskandidaten geforderten Bedingungen der LLE nicht erfüllt. Dies ist auf die hohen clogP-Werte zurückzuführen, die aus den o.g. entsprechenden Tabellen zu entnehmen sind. Auf Grundlage der LLE stellen diese Verbindungen keine geeigneten Entwicklungskandidaten dar (Tabelle 7-9).

Tabelle 7-9: LE- und LLE-Werte der antiplasmodialen Verbindungen, bei denen der IC₅₀-Wert an *P. falciparum* des Stamms 3D7 infizierten Erythrozyten bestimmt wurde.

Verbindung	IC ₅₀ [nM]	LLE ^a	LE ^b
46b	192.5	0.536	0.317
46c	71.6	1.425	0.338
46f	19.2	1.027	0.352
46g	25.3	1.117	0.306
46l	55.5	0.366	0.242
47a	410	0.867	0.292
47e	273	1.134	0.300
47w	1471	0.422	0.222
47x	860	-0.254	0.198
47z	699	-0.164	0.201

^a Berechnung der LLE gemäß Formel $LLE = pIC_{50} - \log P$. Dabei wurden die clogP-Werte aus den o.g. entsprechenden Tabellen entnommen. ^b Berechnung der LE gemäß der Formel

$LE = \frac{1.37 \text{ kcal/mol}}{HA} \times pIC_{50}$, wobei HA die Anzahl an Nicht-Wasserstoffatomen darstellt.²⁶⁴

7.1 Löslichkeitsuntersuchungen

7.1.1 Kinetische Löslichkeit

Die kinetische Löslichkeit gibt die Konzentration der am schnellsten präzipitierenden Form an, welche durch verschiedene etablierte Methoden bestimmbar ist. HOELKE *et al.* führten die kinetischen Löslichkeitsmessungen mittels nephelometrischer, UV-spektrometrischer und einer HPLC-Methode durch.³²⁸ Sie schlussfolgern für die nephelometrische Detektion zwar den geringsten Arbeitsaufwand, jedoch auch das höchste Detektionslimit von 2×10^{-5} mol/L. Verglichen hierzu kann für die UV-spektrometrische Vermessung ein Detektionslimit von 5×10^{-7} mol/L bzw. für die HPLC-Methode mit 8×10^{-9} mol/L angegeben werden. Das hohe Detektionslimit der nephelometrischen Bestimmung wird damit begründet, dass bei einer unterhalb von 20 µM vermessenen Probenkonzentration die Anzahl an Partikeln so gering ist, dass keine signifikanten Signale außerhalb des Signalgrundrauschens detektiert werden konnten. Außerdem ist das Detektionslimit stark von dem erhaltenen Hintergrundsignal des *blank*-Werts sowie der Qualität der *well*-Platten abhängig. Trotzdem empfehlen die Autoren die nephelometrische Löslichkeitsbestimmung aufgrund des geringen Arbeitsaufwands zur Abschätzung der Löslichkeit.³²⁸ Auch BEVAN und LLOYD geben für diese Methode ein Detektionslimit in ähnlicher Größenordnung von 54 µM an.²⁴⁸

Darüber hinaus konnten HOELKE *et al.* zeigen, dass durch die für die kinetische Löslichkeit verwendeten Methoden höhere Löslichkeiten ermittelt wurden als durch die thermodynamische Löslichkeitsmessung mittels HPLC.³²⁸ Dies ist schlüssig, da die Verbindungen für die kinetische Löslichkeitsmessung zunächst in DMSO gelöst werden, sodass keine Kristallenergie aufgewendet werden muss, um die Substanzen in Lösung zu bringen.²⁴⁴ Auch der Zusatz von DMSO führt zu einer erhöhten Löslichkeit. Hierdurch kann es zu einer Übersättigung der Lösung kommen, wodurch erhöhte Löslichkeitswerte erhalten werden.^{329,330} Bei sehr gut löslichen Verbindungen wurde allerdings eine höhere thermodynamische als kinetische Löslichkeit beobachtet. Auch dieses Phänomen wird durch die Bildung von übersättigten Lösungen begründet.²⁴⁵ Bei Vermessung der thermodynamischen Löslichkeit wird der Feststoff direkt in einen wässrigen Puffer gegeben.²⁴⁴ Liegt der Feststoff hierbei in kristalliner Form vor, ist die Löslichkeit im Gegensatz zu amorphen Formen zusätzlich reduziert.³³¹ Durch längere Inkubationszeiten stimmen kinetisch generierte Löslichkeitswerte zunehmend mit den thermodynamischen Löslichkeiten überein.²⁴⁴ SAAL und PETERIT konnten zeigen, dass anfangs amorphe Verbindungen sich über die Zeit in kristalline Formen umwandeln. Somit wird mittels kinetischer Löslichkeitsmessung, bedingt durch die kurze Messzeit, vorwiegend die Löslichkeit der amorphen Verbindung detektiert.^{245,328} Bei dem Vergleich von Löslichkeiten unterschiedlicher Verbindungen sollte dementsprechend immer eine Analyse der untersuchten Form erfolgen. Darüber hinaus ist ein Einfluss der Farbe der Verbindungen auf die Streuung des Laserstrahls denkbar. Die hier analysierten Verbindungen waren vorwiegend gelb. BEVAN und LLOYD konnten keine Beeinflussung der Streuung des eingestrahlten Lasers mit einer Wellenlänge von 632.8 nm durch unterschiedlich gefärbte Lösungen feststellen. Lediglich bei blauen Lösungen konnte eine Reduktion auf 63% des Signals in Folge von Absorptionen verglichen zu Wasser detektiert werden.²⁴⁸ Insgesamt wird die kinetische Löslichkeitsbestimmung aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung zur Einschätzung der Löslichkeit besonders für *in vitro*-Assays empfohlen.²⁴⁴

In der vorliegenden Arbeit wurde die kinetische Löslichkeit mittels Laser-Nephelometrie bestimmt. Hierfür wurde das NEPHELOstar *Plus* Nephelometer (BMG LabTech, Ortenberg, Deutschland) verwendet. Das Gerät verwendet einen Laserstrahl (635 nm, 80% Intensität), welcher senkrecht durch eine transparente, plane 96-*well*-Platte gestrahlt wird. In Folge von Präzipitationen wird der Laserstrahl gestreut. Die Intensität der Streuung wird gemessen und gegen die Konzentration der Probe aufgetragen. Bei keiner Trübung wird dementsprechend auch keine Streuung gemessen, sodass eine horizontal verlaufende Basislinie resultiert.

Bei Messung einer Trübung ergibt sich eine konstant ansteigende Gerade, da die Intensität der Streuung proportional zur Menge an ungelöstem Feststoff ist. Der Schnittpunkt der Geraden stellt einen *kick-off*-Punkt dar, an dem die kinetische Löslichkeit abgelesen werden kann.

Zunächst wurden die Platten ohne Inhalt vermessen, um den Hintergrund für jedes individuelle *well* zu quantifizieren. Dies ist notwendig, da die Messung der Laserstreuung so sensitiv ist, dass in Abhängigkeit von der Qualität der Mikrotiterplatten jede Kavität bereits minimal differenzierende Nullwerte erzeugt. Anschließend wurde jede Verbindung mindestens viermal vermessen. Hierfür wurden zwei unabhängige Stammlösungen in Konzentrationen von 1 bis 10 mM in DMSO hergestellt. Von jeder Stammlösung wurden zwei Verdünnungsreihen erstellt. **46i** und **46j** bildeten aufgrund der guten Löslichkeit eine Ausnahme. Hier wurden anstelle der zwei Verdünnungsreihen von je zwei Stammlösungen drei bzw. fünf Einwaagen jeweils einmal vermessen. Auf der Grundlage von Vorexperimenten wurden die Verdünnungen so gewählt, dass jeweils mindestens drei Konzentrationen unterhalb und oberhalb des erwarteten *kick-off*-Punkts vermessen werden konnten. Durch Verdünnung mit Phosphatpuffer (pH 7.4) wurde die finale Konzentration hergestellt. Dabei wurde eine maximale DMSO-Konzentration von 1% erzielt, welche dem von KERNs *et al.* empfohlenen Grenzwert entspricht.²⁴⁴

Zur Auswertung wurden mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 2013) zwei Ausgleichsgraden erstellt. Durch die Bestimmung des Schnittpunkts wurde die kinetische Löslichkeit ermittelt (Abbildung 7-1). Bei Vermessung von zwei unabhängigen Proben wurden beide Werte in Klammern angegeben. Bei Vermessung von mehr als zwei unabhängigen Proben wurde die Standardabweichung angegeben.

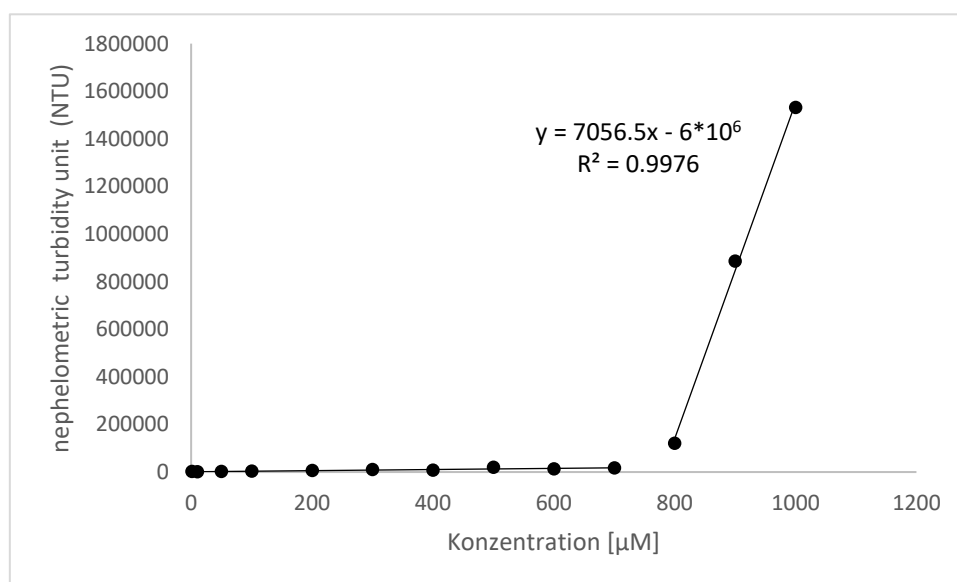


Abbildung 7-1: Darstellung einer Löslichkeitsmessung zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit der gut löslichen Verbindung **46i** mittels Nephelometrie. x-Achse: Konzentration in μM; y-Achse: Intensität des Streulichts in NTU (*nephelometric turbidity unit*). Der *kick-off*-Punkt liegt bei dieser Messung bei $x = 777.7 \mu\text{M}$.

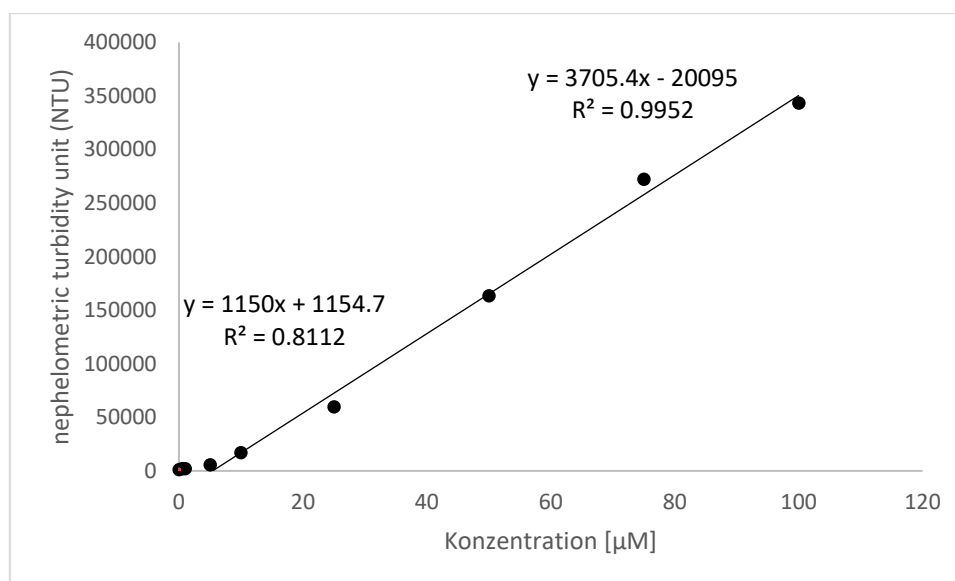


Abbildung 7-2: Darstellung einer Löslichkeitsmessung zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit der schlecht löslichen Verbindung **46f** mittels Nephelometrie. x-Achse: Konzentration in μM ; y-Achse: Intensität des Streulichts in NTU. Der *kick-off*-Punkt dieser Messung liegt hier bei $x = 4.6 \mu\text{M}$.

Sämtliche Verbindungen mit Ausnahme von **46i**, **46j**, **47k** und **47o** wiesen eine kinetische Löslichkeit von weniger als $20 \mu\text{M}$ auf, was unterhalb des von HOELKE *et al.*³²⁸ bestimmten Detektionslimits für diese Methode liegt. Auch die als Salz gefällten Verbindungen (**47r** = $8.8 \mu\text{M}$, **47af** = $14.6 \mu\text{M}$, Tabelle 7-10, Tabelle 7-11) konnten den Grenzwert von $20 \mu\text{M}$ nicht überschreiten.

Dabei hat auch das Gegenion einen Einfluss auf die Löslichkeit.²⁵⁰ Da in der vorliegenden Arbeit ein natriumchloridhaltiger Phosphatpuffer verwendet wurde, kann durch den Eigenion-Effekt die Löslichkeit der als Hydrochlorid dargestellten Verbindungen zusätzlich reduziert sein. Dieses Phänomen wird auch als *salting out* bezeichnet.²⁵⁶ Jedoch sind auch die vorhergesagten Löslichkeiten sehr gering (Tabelle 7-10, Tabelle 7-11), sodass die schlechte Löslichkeit vermutlich größtenteils aus den Strukturmerkmalen resultiert. **46i** und **46j** besitzen eine Carbonsäure-Struktur, die in dem Phosphatpuffer bei pH 7.4 dissoziiert vorliegt. Hiermit ist die deutlich gesteigerte Löslichkeit dieser beiden Verbindungen zu erklären. Auch für **47k** und **47o** konnten kinetische Löslichkeiten oberhalb des Detektionslimits ermittelt werden. Diese Verbindungen sind ein Beispiel dafür, dass durch Verringerung der Anzahl an Aromaten bzw. durch Erhöhung der Fraktion sp^3 -hybridisierter Kohlenstoffatome die Löslichkeit gesteigert werden kann. Alle weiteren Verbindungen weisen sehr schlechte Löslichkeiten zwischen $1 - 20 \mu\text{M}$ auf und wurden aufgrund der Unterschreitung des Detektionslimits nicht direkt verglichen. Sensitivere Methoden mit einem niedrigeren Detektionslimit sind hier zur besseren Vergleichbarkeit der Löslichkeitswerte nötig. Hierzu gehören etwa etablierte UV-metrische- oder auch HPLC-Methoden.³²⁸

Insgesamt konnte keine Verbesserung der Löslichkeit durch Einführung basischer Komponenten erzielt werden. Im Gegensatz dazu führten Carbonsäure-Strukturen oder aliphatische Substituenten zu einer Erhöhung der kinetischen Löslichkeit (Tabelle 7-10, Tabelle 7-11).

7.1.2 Thermodynamische Löslichkeit

Bei der thermodynamischen Löslichkeitsmessung wird die maximal erreichbare Konzentration einer Verbindung, die im Gleichgewicht zu ihrer stabilsten ungelösten Form vorliegt, bestimmt. Hier wurde die „Goldstandard“ *shake-flask*-Methode mittels HPLC modifiziert nach WÖLFEL angewendet.³³²

Dazu wurden in zwei unabhängigen Ansätzen die zu untersuchenden Substanzen in 400 µL eines natriumchloridhaltigen Phosphatpuffers (pH 7.4) gegeben. Anschließend wurden die Proben je nach Gleichgewichtseinstellung für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in einem Schüttelinkubator bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Vor Vermessung der Proben war stets noch ein Bodensatz sichtbar, welcher mit einem integrierten Filter vor Messung der Probe von der Lösung abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde mit der angegebenen isokratischen HPLC-Methode vermessen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich von den Verbindungen, bei denen ein Signal detektiert werden konnte, eine Kalibriergerade erstellt. Das Integral des Signal-Peaks korreliert dabei mit der Konzentration der Probe. Die quantitative Auswertung erfolgte bei zwei Wellenlängen (254 nm und 280 nm). Bei **46i** konnte stetig eine geringe Steigerung der thermodynamischen Löslichkeit nach jeder Inkubationsstufe detektiert werden, sodass auch nach 96 h Inkubation noch kein Gleichgewicht erreicht wurde. Es wird angenommen, dass die Gleichgewichtseinstellung nur sehr langsam erfolgt und somit kontinuierlich nach jeweils weiteren 24 h Inkubation eine um 5-10 µM/L erhöhte Löslichkeit detektiert wurde. Nach 96 h wurde keine weitere Löslichkeitsmessung mehr durchgeführt. Außerdem stellte sich heraus, dass bei den hier vorliegenden schwer löslichen Verbindungen exakte Substanzeinwaagen zur Probenvorbereitung von Vorteil sind. Bei stark variierenden Probenmengen wichen die Löslichkeitswerte untereinander ab, obwohl jeweils noch Bodensatz nach der jeweiligen Inkubationszeit vorhanden war. Dies wird auf die für Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel unterschiedlich zur Verfügung stehende Oberfläche bei abweichenden Einwaagen zurückgeführt.

Sofern in den Chromatogrammen nach 48 h Inkubation kein Signalpeak der Verbindung bei der gegebenen Retentionszeit detektiert werden konnte, wurde die Löslichkeit mit „nicht detektiert (n. d.)“ angegeben. Es wurden lediglich für die Verbindungen **46i** und **46j** thermodynamische Löslichkeiten detektiert. Dabei ist die Löslichkeit von **46i**, ähnlich zu ihrer kinetischen Löslichkeit, höher als die Löslichkeit von **46j**. Insgesamt sind jedoch beide Werte niedriger als die entsprechenden ermittelten kinetischen Löslichkeiten (Tabelle 7-10, Tabelle 7-11). Dies ist mit dem DMSO-Zusatz bei der kinetischen Löslichkeitsmessung erklärbar.

Die detektierte thermodynamische Löslichkeit dieser beiden Verbindungen resultiert aus der bei pH 7.4 teilweise dissoziierten Form der Carbonsäure-Teilstruktur. Bei allen weiteren Verbindungen wurde auch nach 48-stündiger Inkubation kein Signal bei der entsprechenden Retentionszeit mittels HPLC und UV-Detektion bei den angegebenen Wellenlängen beobachtet (Tabelle 7-10, Tabelle 7-11).

Eine Steigerung der thermodynamischen Löslichkeitswerte kann z. B. durch ein anderes Medium erzielt werden. So empfiehlt KERN *et al.* Medien zu nutzen, die auch in biologischen *in vivo* Testungen wiederzufinden sind, um diese Testbedingungen möglichst gut zu simulieren. Anstelle des hier verwendeten Phosphatpuffers kann u. a. das von der USP (*United States Pharmacopeia*) definierte SIF (*simulated intestinal fluid*) oder SGF (*simulated gastric fluid*) genutzt werden.²⁴⁴ Auch sog. FeSSIF- (*fed state simulated intestinal fluid*) oder FaSSIF (*fasted state simulated intestinal fluid*)-Testmedien, die Gallensalze oder Lecithin beinhalten, können durch Mizellenbildung und anschließende Solubilisierung schlecht löslicher Verbindungen die ermittelten Löslichkeitswerte erhöhen.^{329,333,334} Eine Modifizierung der Methode haben CHEN *et al.* veröffentlicht. Sie nutzen zur Gleichgewichtseinstellung eine Behandlung der Probe im Ultraschallbad mit anschließendem Vortexen. Danach wurden die Proben filtriert und mit Hilfe eines UV-plate reader analysiert.³³⁵ So können lange Inkubations- sowie HPLC-Analysenzeiten entfallen und Fließmittel gespart werden. Zur Vergleichbarkeit der im Arbeitskreis erhaltenen Löslichkeiten wurde diese Methode jedoch nicht verwendet.

In Tabelle 7-10 und Tabelle 7-11 sind sowohl die erläuterten, praktisch ermittelten Löslichkeiten als auch die vorhergesagten Löslichkeitswerte nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³, ESOL²⁵⁸ oder ALI *et al.*²⁵⁹ angegeben.

Da die Löslichkeitsvorhersage nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³ nur für organische Nicht-Elektrolyte gilt, wurde für die Löslichkeitsvorhersage der als Hydrochlorid dargestellten Verbindungen **47r** und **47af**, die Carbonsäure-haltigen Verbindungen **46i** und **46f** sowie die bei einem pH von 7.4 teilweise protonierten Verbindungen **47ac** und **47ag** nach der modifizierten Gleichung von YALKOWSKY³³⁶ durchgeführt. Für **47r** und **47af** wurden dabei deutlich höhere Löslichkeitswerte vorhergesagt, als sie in den praktischen Durchführungen ermittelt wurden. Für **46i** und **46j** wurden dahingegen gute Löslichkeiten vorhergesagt, die sowohl durch die kinetische als auch die thermodynamische Löslichkeitsmessung ermittelt wurden. Auch wurden für **47k** und **47o**, bei denen der aromatische Amid-Rest gegen einen aliphatischen Substituenten ausgetauscht wurde, vergleichbare Löslichkeitswerte vorhergesagt, wie sie durch die kinetischen Löslichkeitsmessungen ermittelt wurden. Alle weiteren Verbindungen weisen vorhergesagte Löslichkeitswerte im niedrig mikromolaren (vgl. **47l-47n** und **47p**) oder nanomolaren Bereich auf. Diese sind damit insgesamt als schlecht löslich einzustufen.

Ein direkter Vergleich dieser sehr schlechten vorhergesagten Löslichkeitswerte mit den ermittelten kinetischen Löslichkeiten von weniger als 20 μM ist aufgrund der Unterschreitung des Detektionslimits der Methode nicht sinnvoll.

Die mit Hilfe der ESOL-Gleichung²⁵⁸ vorhergesagten Löslichkeiten sind teilweise vergleichbar zu den Löslichkeitsvorhersagen, die nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³ erhalten wurden. Erneut korrelieren die vorhergesagten Werte für **47k** und **47o** gut mit den kinetisch determinierten Löslichkeiten. Auch die weiteren Verbindungen mit einem aliphatischen Amid-Substituenten (vgl. **47l-47n**, **47p**) weisen eine gute Übereinstimmung zwischen der ermittelten kinetischen Löslichkeit und der Löslichkeitsvorhersage nach ESOL auf. Für die als Hydrochlorid dargestellten Verbindungen **47r** und **47af** werden allerdings vorhergesagte Löslichkeiten im nanomolaren Bereich erhalten. Diese unterscheiden sich sowohl stark von den vorhergesagten Löslichkeitswerten nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³, als auch von den kinetisch determinierten Löslichkeiten. Auch für die weiteren Verbindungen wurden eher schlechte Löslichkeiten im submikromolaren bis nanomolaren Bereich vorhergesagt.

Bei der Löslichkeitsvorhersage nach ALI *et al.*²⁵⁹ fällt auf, dass die durch diese Gleichung vorhergesagten Werte deutlich geringer sind als die bisher berechneten Löslichkeiten nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³ oder ESOL²⁵⁸. Lediglich für die Verbindungen **47k**, **47n** und **47o** wurden Löslichkeiten im unteren mikromolaren Bereich vorhergesagt. Diese liegen jedoch erneut unter den kinetisch ermittelten Löslichkeiten. Für die als Hydrochlorid generierten Verbindungen **47r** und **47af** wurden im Gegensatz dazu Werte im zweistellig mikromolaren Bereich vorhergesagt. Hier liegt die vorhergesagte Löslichkeit über den kinetisch ermittelten Werten. Alle weiteren Verbindungen weisen vorhergesagte Löslichkeiten im unteren nanomolaren Bereich auf.

Insgesamt können die Verbindungen **47k** und **47o** hinsichtlich ihrer kinetischen Löslichkeit als teilweise löslich eingestuft werden. **46i** und **46j** stellen gut lösliche Verbindungen dar. Bei Betrachtung der thermodynamischen Löslichkeit wird lediglich **46i** als gut und **46j** als teilweise löslich eingestuft. Die vorhergesagten Löslichkeitswerte variieren untereinander und weichen darüber hinaus von den praktisch determinierten Löslichkeitswerten teilweise stark ab. Die Anwendbarkeit der Gleichungen ist stark von den Strukturen abhängig, sodass keine der drei Vorhersagemöglichkeiten als optimal empfohlen werden kann. Dementsprechend sollte die Löslichkeit durch etablierte experimentelle Methoden ermittelt werden.

In Tabelle 7-10 und Tabelle 7-11 sind sowohl die experimentell ermittelten kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten als auch die vorhergesagten Löslichkeiten nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³, ALI *et al.*²⁵⁹ und mit Hilfe der ESOL-Gleichung²⁵⁸ aufgeführt.

Tabelle 7-10: Experimentell ermittelte kinetische und thermodynamische Löslichkeiten sowie die vorhergesagten Löslichkeiten nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³, ALI *et al.*²⁵⁹ und mit Hilfe der ESOL-Gleichung²⁵⁸.

Verbindung	$S_{\text{kin., pH7.4}} [\mu\text{M}]$	$S_{\text{therm., pH7.4}} [\mu\text{M}]$	$cS_{\text{Yalkowsky}} [\mu\text{M}]^a$	$cS_{\text{ESOL}} [\mu\text{M}]^c$	$cS_{\text{Ali}} [\mu\text{M}]^d$
46a	12.2 (11.7 - 12.7)	n. d.	0.00295	0.00385	0.000257
46b	15.5 (15.0 - 16.0)	n. d.	0.0324	0.246	0.0111
46c	3.9 (3.5 - 4.2)	n. d.	0.0457	0.662	0.0201
46d	9.7 (8.9 - 10.5)	n. d.	0.0117	0.0945	0.00414
46e	11.3 (11.2 - 11.4)	n. d.	0.00339	0.0477	0.00128
46f	7.3 (4.6 - 10.0)	n. d.	0.00851	0.123	0.00322
46g	11.2 (10.6 - 11.7)	n. d.	0.0407	0.0728	0.00373
46h	14.2 (11.3 - 17.1)	n. d.	0.0355	0.0359	0.00345
46i	745.5 ± 27.9	208.3 (153.7 - 262.9)	891 ^b	0.346	0.0132
46j	420.7 ± 59.9	54.0 (53.0 - 55.0)	1514 ^b	0.616	0.0287
46k	11.0 (10.0 - 11.9)	n. d.	0.000631	0.00145	0.0000721
46l	5.1 (2.9 - 7.3)	n. d.	0.00457	0.00805	0.000610
47a	0.7 (0.2 - 1.3)	n. d.	0.0324	0.190	0.00407
47b	2.0 (0 - 3.9)	n. d.	0.138	0.519	0.0137
47c	3.1 (2.3 - 3.9)	n. d.	0.0537	0.190	0.00541
47d	3.8 (2.7 - 4.9)	n. d.	0.155	0.517	0.0146
47e	3.4 (3.3 - 3.5)	n. d.	0.0646	0.375 ^f	0.00632
47f	7.0 (4.7 - 9.2)	n. d.	0.1514	0.375	0.0102
47g	3.8 (3.7 - 3.9)	n. d.	0.155	1.01	0.0153
47h	5.0 (4.9 - 5.1)	n. d.	0.138	0.517	0.0137
47i	3.4 (3.3 - 3.4)	n. d.	0.316	1.41	0.0323
47k	34.0 (31.7 - 36.2)	n. d.	38.0	34.3	3.71
47l	6.7 (5.6 - 7.7)	n. d.	2.40	0.495	0.0641
47m	11.9 (11.3 - 12.4)	n. d.	5.37	9.10	0.560
47n	19.2 (17.5 - 20.8)	n. d.	17.0	13.5	1.56
47o	48.2 (44.7 - 51.8)	n. d.	87.1	27.4	5.86
47p	6.8 (6.2 - 7.3)	n. d.	7.41	3.45	0.506
47q	3.8 (1.1 - 6.5)	n. d.	0.0710	0.0116	0.000964
47r	8.8 (8.7 - 8.8)	n. d.	1576 ^b	0.0334	55.1
47s	1.2 (0.7 - 1.6)	n. d.	0.0724	0.115	0.00473
47t	5.1 (4.0 - 6.2)	n. d.	0.0151	0.0403	0.00130

Tabelle 7-11: Fortsetzung der experimentell bestimmten kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten sowie die vorhergesagten Löslichkeiten nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³, ALI *et al.*²⁵⁹ und mit Hilfe der ESOL-Gleichung²⁵⁸.

Verbindung	$S_{\text{kin., pH7.4}}$ [μM]	$S_{\text{therm., pH7.4}}$ [μM]	$cS_{\text{Yalkowsky}}$ [μM] ^a	cS_{ESOL} [μM] ^c	cS_{Ali} [μM] ^d
47u	3.7 (2.6 – 4.7)	n. d.	0.0372	0.0403	0.00215
47v	2.7 (2.5 – 2.8)	n. d.	0.263	0.115	0.00974
47w	5.4 (4.4 – 6.3)	n. d.	0.0417	0.115	0.00347
47x	9.4 (9.2 – 9.5)	n. d.	0.0710	0.0201	0.000791
47y	4.4 (4.3 – 4.4)	n. d.	0.126	0.313	0.00960
47z	7.7 (5.9 – 9.5)	n. d.	0.0427	0.0201	0.000595
47aa	4.5 (3.9 – 5.0)	n. d.	0.0138	0.0403	0.00123
47ab	5.0 (4.1 – 5.9)	n. d.	0.0407	0.110	0.00337
47ac	12.8 (6.1 – 19.5)	n. d.	0.361 ^b	0.226	0.0148
47ad	6.2 (5.2 – 7.1)	n. d.	0.132	0.0541	0.00167
47ae	6.6 (6.5 – 6.7)	n. d.	0.0331	0.0201	0.000517
47af	14.6 (13.0 – 16.2)	n. d.	1554 ^b	0.0797	43.9
47ag	14.5 (14.0 – 14.9)	n. d.	0.329 ^b	0.0828	0.00942

^a Theoretische Löslichkeit nach JAIN und YALKOWSKY²⁵³; berechnet nach der Gleichung $\log S_0 = 0.5 - \log P - 0.01 \times (\text{MP} - 25)$ und mit den in dieser Arbeit angegebenen $\log P$ -Werten.

^b Berechnet mit der modifizierten GSE, die für schwache Säuren gilt³³⁶: $S_{\text{total}} = S_0 \times [1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_A}]$; mit $\text{pH} = 7.4$ und $\text{pK}_A(\mathbf{47r}) = 9.16$, $\text{pK}_A(\mathbf{47ac}) = 9.16$, $\text{pK}_A(\mathbf{47af}) = 9.90$, $\text{pK}_A(\mathbf{47ag}) = 9.16$, $\text{pK}_A(\mathbf{46i}) = 3.49$, $\text{pK}_A(\mathbf{46j}) = 3.49$, bestimmt mit MarvinSketch³²⁶. ^c Theoretische Löslichkeit nach der ESOL-Gleichung²⁵⁸, bestimmt mit SwissADME³²⁷. ^d Theoretische Löslichkeit nach ALI *et al.*²⁵⁹, berechnet nach der Gleichung $\log S = -1.0144 \times \log P - 0.0056 \times (\text{MP} - 25) - 0.0134 \times \text{TPSA} + 0.5134$ mit den in dieser Arbeit angegebenen Parametern.

8 Zusammenfassung

Malaria ist eine der häufigsten und gefährlichsten Infektionskrankheiten weltweit, die durch Parasiten der Gattung *Plasmodium* ausgelöst wird. Aufgrund der zunehmenden Resistenzen der Erreger gegen die derzeit eingesetzten Arzneimittel werden zusätzliche antiplasmodiale Wirkstoffe mit neuen Wirkungsmechanismen benötigt. In vorangehenden Untersuchungen identifizierten FUGEL und MASCH die Substanzklasse der 2-Acyl-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridine als Hemmstoffe des plasmodialen Enzyms *PfGSK-3*. Einzelne Vertreter dieser Wirkstoffklasse, wie Verbindung **39b**, zeigten auch antiplasmodiale Aktivität in einstellig mikromolaren Konzentrationen. Analoge Carbonsäureamide, wie Verbindung **42**, erwiesen sich jedoch als inaktiv gegenüber der postulierten biologischen Zielstruktur *PfGSK-3*. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass auch **42** ein potenter antiplasmodialer Wirkstoff ist.

Die hier vorgelegte Arbeit war dem Design und der Synthese von Analoga der Verbindung **42** gewidmet, um Struktur-Eigenschafts- sowie Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen. Für die Herstellung neuer Strukturen wurden literaturbekannte Synthesesequenzen abgewandelt, wobei die Thieno[2,3-*b*]pyridin-Grundstruktur jeweils durch eine Thorpe-Ziegler-Zyklisierung als Schlüsselschritt gebildet wurde. Die bei Kooperationspartnern durchgeführten biologischen Testungen ergaben, dass in dieser Substanzklasse am Aromaten in 4-Position die *ortho*-Chlor-Substitution verzichtbar ist und stattdessen eine *meta*-Methylgruppe besonders gute antiplasmodiale Aktivitäten ergibt. Substitutionen mit Aminogruppen in *para*-Position dieses Aromaten führen nicht zu einer Aktivitätssteigerung und verbessern auch die Löslichkeit nicht signifikant. Die Cyan- und Aminogruppe in 5- bzw. 6-Position am Thieno[2,3-*b*]pyridin kann durch aliphatische Reste oder Carbonsäurestrukturen ersetzt werden. Zu dieser Substanzgruppe gehört Verbindung **46f**, die mit einem IC₅₀-Wert von 19.2 nM die potenteste antiplasmodiale Verbindung der hier vorgelegten Arbeit darstellt. Strukturen wie **42** und **46f** zeigen zwar deutliche antiplasmodiale Aktivität, hemmen jedoch nicht das plasmodiale Enzym *PfGSK-3*. Wird der aromatische Substituent am Amid-Stickstoffatom gegen einen aliphatischen Rest ersetzt, kehren sich diese Eigenschaften um. So ist das *N*-Methylamid **47k** ein *PfGSK-3*-Inhibitor, zeigt aber keine nennenswerte antiplasmodiale Aktivität. Ebenso wie die Verbindungen **42**, **46f** und **47k** zeigt der Carbonsäureester **46h** antiplasmodiale Aktivität bei schlechter Wasserlöslichkeit. Die entsprechende Carbonsäure **46i** ist dagegen deutlich besser wasserlöslich, weist jedoch keine antiplasmodiale Aktivität mehr auf. Stabilitätsuntersuchungen ergaben außerdem, dass sich die potenteste Verbindung **46f** unter Lichtbestrahlung in gelöster Form über einen Zeitraum von einigen Tagen zersetzt, unter Lichtausschluss jedoch über längere Zeit stabil ist.

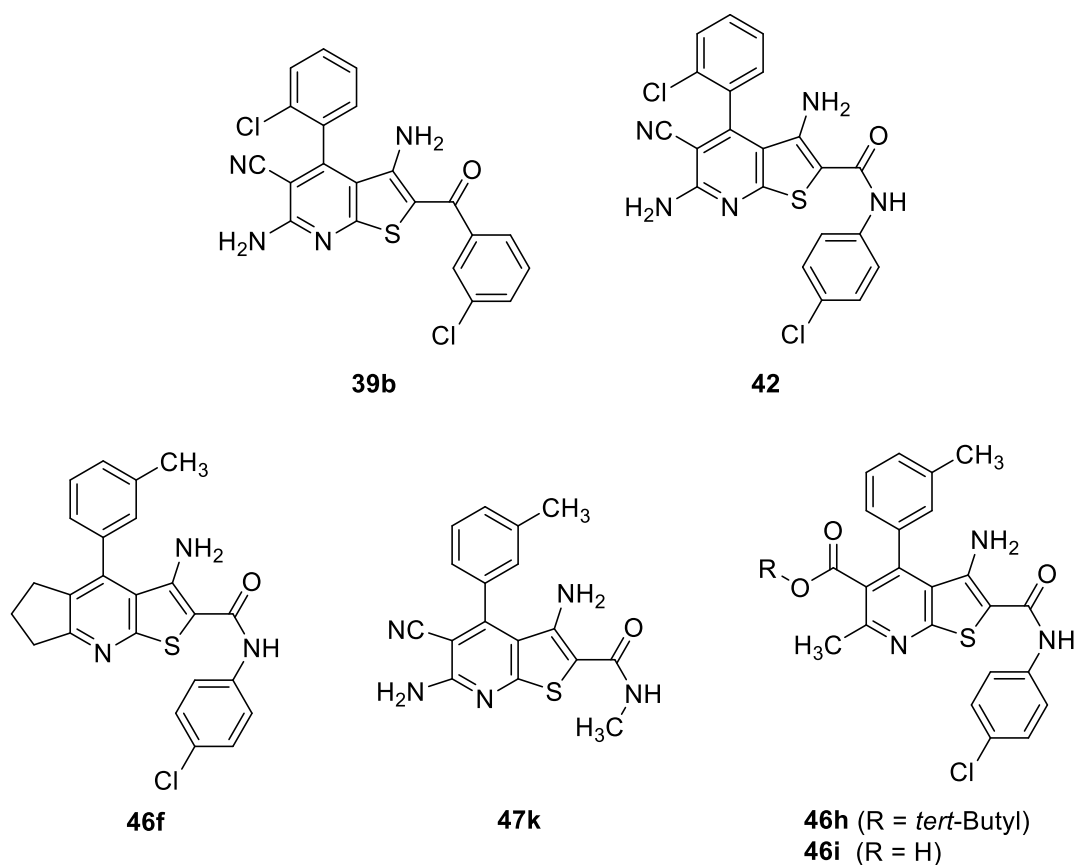


Abbildung 8-1: Beispiele für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf Grundlage der bekannten Verbindungen **39b** und **42**.

9 Summary

Parasites of the genus *Plasmodium* induce malaria, one of the most common and dangerous infectious diseases worldwide. Due to an increasing resistance of the pathogens to currently used drugs, additional antiplasmodial agents with new mechanisms of action are needed. In previous studies, FUGEL and MASCH identified the substance class of 2-acyl-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridines as inhibitors of the plasmodial enzyme *PfGSK-3*. Individual representatives of this substance class, such as compound **39b**, also showed antiplasmodial activity in single-digit micromolar concentrations. Analogous carboxylic acid amides, such as compound **42**, however, proved to be inactive towards the postulated biological target structure *PfGSK-3*. Yet, recent investigations have shown that **42** is also a potent antiplasmodial agent.

The work presented here was dedicated to the design and synthesis of analogues of compound **42** to establish structure-property and structure-activity relationships. For the preparation of new structures, literature-known syntheses sequences were modified, whereby the thieno[2,3-*b*]pyridin basic structure was formed by a Thorpe-Ziegler cyclization as a key step in each case. Biological tests performed at cooperation partners showed that in this substance class *ortho*-chlorine substitution on the aromatic substituent in the 4-position is dispensable and instead a *meta*-methyl group shows particularly good antiplasmodial activities. Substitutions with amino groups in the *para* position of this aromatic ring do not lead to an increase in activity and do not significantly improve the solubility. The cyano and amino groups in the 5-position and 6-position on thieno[2,3-*b*]pyridine-scaffold can be replaced by aliphatic residues or carboxylic acid structures. Compound **46f** belongs to this group of substances. With an IC_{50} value of 19.2 nM, it is the most potent antiplasmodial compound in the work presented here. Structures such as **42** and **46f** show clear antiplasmodial activity, but do not inhibit the plasmodial enzyme *PfGSK-3*. By replacing the aromatic substituent on the amide nitrogen atom with aliphatic residues, these properties are reversed. For example, *N*-methylester **47k** is a *PfGSK-3* inhibitor but does not exhibit significant antiplasmodial activity. Like the compounds **42**, **46f** and **47k**, the carboxylic acid ester **46h** shows antiplasmodial activity along with poor water solubility. The corresponding carboxylic acid **46i**, on the other hand, is much more water soluble, but no longer exhibits antiplasmodial activity. Stability tests also showed that the most potent compound **46f** decomposes in dissolved form under light irradiation over a period of several days but is stable over a longer period under exclusion of light.

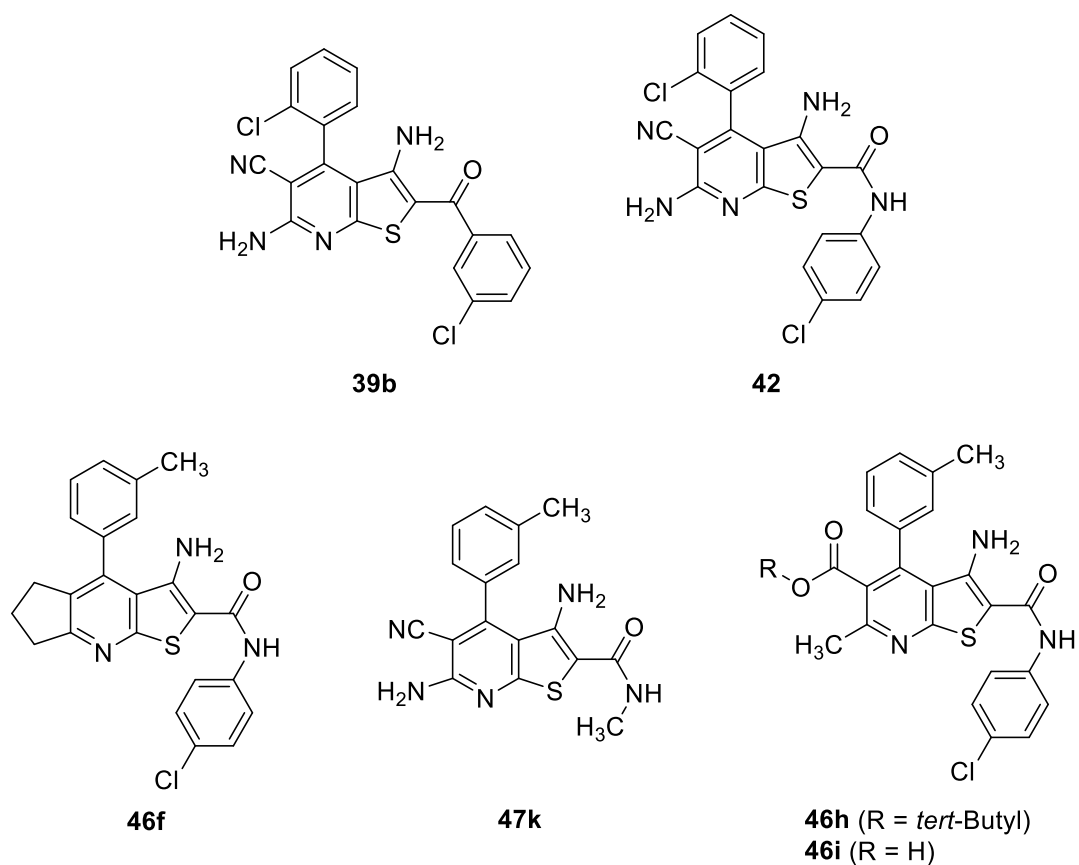


Abbildung 9-1: Examples for the compounds synthesized in this thesis based on the known compounds **39b** and **42**.

10 Experimenteller Teil

10.1 Molekulares *docking*

Für die *docking*-Studien wurde zunächst der Ligand in dem Programm MOE 2018.01 energieminiert und als mol2-Datei gespeichert. Die Homologiemodelle der PfGSK-3²²¹ und die Kristallstruktur der HsGSK-3 (PDB: 3ZDI¹⁷⁴) wurden in MOE mit Hilfe der *QuickPrep*-Funktion (*use structure preparation, preserve sequence and neutralize, use protonate 3D for protonation, allow ASN/GLN/HIS flips in protonate 3D, delete water molecules farther then 4.5 Å from Ligand or Receptor, tether receptor (strength 10, buffer 0.25), fix atoms farther than 8 Å from ligands, hydrogens close to ligands will not be fixed, refine to RMS gradient of 0.1 kcal/mol/Å*) modifiziert.³³⁷ Dabei werden Wassermoleküle außerhalb der Bindetasche eliminiert, fehlende Protonen hinzugefügt, mögliche inkorrekte Strukturen berichtigt und die Orientierung von Aminosäuren wie Asparagin, Glutamin und Histidin angepasst.³³⁷ Die Modelle wurden als mol2-Datei gespeichert. Es wurde das Kraftfeld AMBER 10: EHT (*assisted model building and energy refinement: Extended Hueckel theory*) zur Berechnung der Molekulardynamik in MOE genutzt.³³⁷ Anschließend wurden die *docking*-Analysen mit den bearbeiteten Dateien über Hermes (Vers. 1.6.2) mit Hilfe der Software GOLD (GOLD Suite Vers 5.2.2) ausgeführt.²⁷⁵ Dabei wurden über die *wizard*-Funktion in Hermes die auszuführenden Parameter eingestellt. Zunächst wurden fehlende Protonen der entsprechenden Proteinkinase ergänzt. Für Wassermoleküle innerhalb der ATP-Bindetasche wurde die *toggle*-Funktion aktiviert. Weitere Wassermoleküle wurden extrahiert. Im Homologiemodell wurde als Bezugspunkt der ATP-Bindetasche die Carbonylfunktion von Glu158.A gewählt. Um diesen Bezugspunkt wurde der Interaktionsraum mit 10 Å definiert. Weiterhin wurde der ChemScore mit dem *kinase template* zur Bewertung der *docking*-Lösungen genutzt. Für den Liganden wurden die Parameter *flip all planar R-NR1R2, flip ring-NHR, flip Ring NR1R2* und *flip protonated carboxylic acids* aktiviert. Der frühzeitige Abbruch von *docking*-Durchläufen wurde deaktiviert. Außerdem wurde die *search efficiency* auf 200% festgelegt sowie die Funktion *generate diverse solutions* aktiviert. Pro Ligand wurden zehn Durchläufe ausgeführt. Die Lösungen wurden mit UCSF Chimera (Vers. 1.13.1) visualisiert und bewertet.³³⁸

10.2 Geräte und Methoden

Dünnschichtchromatographie

Polyester-Fertigfolien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, 0.20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland.

Detektion im UV-Kabinett bei 254 und 366 nm, Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz. Als Fließmittel wurden Mischungen aus Petrolether, Hexan, Toluol, Ethylacetat, Methanol, Ethanol, Triethylamin, Essigsäure, Ameisensäure, Dichlormethan, *tert*-Butylmethylether und Propan-2-ol verwendet.

Elementaranalytik (CHN)

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San José, CA, USA. Die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte wurden als Mittelwerte von Doppelbestimmungen in Prozent angegeben.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), analytisch

Gerät für die isokratische Elution (isokr.) (System 1): Merck Hitachi LaChrom Elite®: Pumpe: L-2130, Autosampler: L-2200, Säulenofen: L-2300 (40 °C), Dioden-Array-Detektor: L-2450, Organizer Box: L-2000, Software: EZChrom Elite, Version 3.3.2 SP2, Fa. Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokio, Japan. Säulenhalter: Merck LiChroCART® 125-4, Trennsäule: LiChrospher® 100, RP-18, 5 µM und Hibar®RT250-4, Purospher®STAR, RP-18 endcapped, 5 µM, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland.

Gerät für die Gradientenelution (grad.) (System 3): VWR Hitachi Chromaster: Dioden-Array-Detektor: 5430, Säulenofen: 5310 (40 °C), Autosampler: 5260, Pumpe: 5110, Software: Chromaster System Manager Version 1.1, Fa. Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokio, Japan. Säulenhalter: LiChroCART 125-4, Säule: LiChrospher 100, RP-18, 5 µM, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland.

Probenvorbereitung: Wenige hundert Mikrogramm Substanz wurden in 300 µL DMSO gelöst (HPLC Reinheit). Es wurde durch ein Whatman Mini-UniPrep™-Filter (0.45 µm) filtriert. Die Injektion betrug 3-30 µL in das entsprechende System. Retentionszeiten zwischen 3-8 min und Absorptionen von 0.3-1.5 mAU wurden angestrebt.

Elution: Flussrate 1.000 mL/ min. Gesamtlaufzeit der isokratischen Elution: 15 min. Gesamtlaufzeit der Gradienten-Elution: 20 min. Verlauf der Gradientenelution: 0-2 min: 10% ACN; 2-12 min 10 → 90% ACN (linear); 12-20 min: 90% ACN.

Elutionsmittel: Bei Gradientenelution wurde ein Gemisch aus ACN und H₂O (bidest.) verwendet. Für die isokratische Elution wurde als Fließmittel ein ACN/H₂O-Gemisch oder ein ACN/Puffer-Gemisch in der angegebenen Zusammensetzung verwendet. Als Puffer wurde ein Gemisch aus Triethylamin (20 mL), Natriumhydroxid (242 mg) in H₂O (bidest.) *ad* 1.0 L verwendet. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.7.

Detektion: Isokratische Elution: DAD bei 254 nm und 280 nm. Gradientenelution: 254 nm und 280 nm.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung nach der 100%-Methode. Integrationsausschluss: 0-1.6 min (System 1) und 0-2.0 min (System 3). Bestimmung der Gesamtretentionszeit (t_{ms}) und der Totzeit (t_m) bezogen auf DMSO. Absorptionsmaxima (λ_{max}) aus den UV-Spektren des DAD entnommen.

System 1: EZChrom Elite System Version 3.3.2 SP2; *sampling period*: 400 ms, Savitsky-Golay-*smoothing*-Funktion über neun Messpunkte gemittelt:

$$\frac{a_1f_1 + a_2f_2 + \dots a_9f_9}{norm} \frac{a_2f_1 + a_3f_2 + \dots a_{10}f_9}{norm} \frac{a_3f_1 + a_4f_2 + \dots a_{11}f_9}{norm}$$

mit f_1 : -21, f_2 : 14, f_3 : 39, f_4 : 54, f_5 : 59, f_6 : 54, f_7 : 39; f_8 : 14; f_9 : -21 und *norm*: 231.0. *Threshold*: 1000.

System 3: Chromaster System Manager Version 1.1, *sampling period*: 50 ms, *sensitivity*: 10 bzw. 50, *N-Method*: 0, *bunching/smoothing*: aus.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), präparativ

HPLC: LaPrep P 110 Präparative HPLC Pumpe, LaPrep P 216 Fraktionssammler, LaPrep P 311 Spektralphotometer. Probenschleife: max. Injektionsvolumen 5 mL, Säulenrohrlänge: 125 mm, Selbstfüllstand: NW 25, Software: EZChrom Elite, Vers. 3.1.4. Säulenmaterial: LiChrospher 100, RP-18, 12 μ M, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland.

Probenvorbereitung: Etwa 100 mg der Verbindung wurden in etwa 4 mL DMSO gelöst. Die Probe wurde als *sandwich*-Injektion mit etwa 500 μ L DMSO jeweils am Anfang und am Ende in die Probenschleife gegeben.

Elution: Flussrate: 40 mL/min, Laufzeit: 15-100 min.

Elutionsmittel: Entsprechende ACN/Wasser (bidest.)-Gemische.

Detektion: UV-Detektion bei 254 nm.

Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte mit der Kapillarmethode in einseitig geöffneten Glaskapillaren mit einem Electrothermal IA9200, Fa. Cole-Parmer, Stone, Vereinigtes Königreich.

Infrarotspektroskopie (IR)

Nicolet FT-IR 200 Spektrometer, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA. Vermessung Feststoffe: Kaliumbromidpresslinge. Vermessung ölig Substanzen: KBr oder NaCl-Fenster.

Inkubationsschüttler

IKA® KS 3000 ic control. Externer Kühler: IKA® KV 600 digital – 230 V, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden vom Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig, Deutschland aufgenommen.

Gerät EI (niedrige Auflösung): Thermo Finnigan MAT95XL, Fa. Thermofinnigan Mat GmbH, Bremen, Deutschland. Auflösung: 2000 (10% Tal Definition), Scans: 40 - 1000 amu (1 sek/Dekade), 40 – 2000 amu (2 sek/Dekade), Temperatur der Ionenquelle: 180 °C, Ionisierungsenergie: 70 eV.

Gerät EI (hohe Auflösung): Thermo Finnigan MAT95XL, Fa. Thermofinnigan Mat GmbH, Bremen, Deutschland. Auflösung: 10000 (10% Tal-Definition); Interner Massenstandard: Perfluorkerosin (PFK), Temperatur der Ionenquelle: 180 °C, Ionisierungsenergie: 70 eV, *peak matching*-Methode.

Gerät ESI: LTQ-Orbitrap Velos ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland. Auflösung: 100000 FWHM (*full width at half maximum*) bei $m/z = 400$ amu, Scans: 50 - 2000 amu, Interner Massenstandard: Tetradecyltrimethylammoniumbromid (0.1 mg/mL), Lösungsmittel: Methanol. Probenkonzentration: Etwa 50 µg/mL, Flussrate: 1 µL/min, Sprühspannung: Pos. Modus: 2.3-2.8 kV, neg. Modus: 1.7-2.5 kV.

Angabe der Molekülionensignale $[M]^{++}$ (EI) oder $[M+H]^+$ (ESI) sowie weitere zuordnungsfähige Signale. Daneben wurden die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Massenzahlen angegeben.

Benchtop-MS

Expression^L CMS-Spektrometer, Fa. Advion, Ithaca, NY, USA. APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*): Messung im pos. und neg. Modus nach Probenzufuhr mittels ASAP-Sonde (*atmospheric solids analysis probe*), Ausstanzung aus einer Dünnschichtchromatographie-Platte (via Plate express®, Fa. Advion, Ithaca, NY, USA) oder Direkteinspritzung der zuvor in Methanol gelösten Probe (~50 µg in 1.5 mL, wovon ~100-150 µL injiziert wurden). Parameter: *source gas temperature*: 350 °C, APCI *corona discharge*: 5.0 µA, *capillary temperature*: 250 °C, *capillary voltage*: 170 V (pos. Modus), 120 V (neg. Modus). ESI: Messung im pos. Modus nach Direkteinspritzung. Lösung in Methanol.

Einstellungen: *source gas temperature*: 250 °C, *capillary temperature*: 250 °C, *capillary voltage*: 180 V (pos. Modus), 120 V (neg. Modus), *spray voltage*: 3500 V (pos. Modus), *spray voltage*: 2500 V (neg. Modus). Software: Advion Mass Express und Advion Data Express, Version 3.1.21.1.

Mikrowelle

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Discover® SP; Synergy™ *application software*; Reaktionsgefäße: 10 mL mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland. JUN-AIR Kompressor, Fa. JUN-AIR Deutschland GmbH, Ahrensburg, Deutschland.

pH-Meter

632 pH-Meter mit Glaselektrode, Fa. Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland.

Nephelometer

NEPHELOStar^{Plus}, Software: Omega 5.11 und MARS 3.20; Fa. BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland.

Waagen

Analysenwaage: Sartorius ENTRIS224I-1S, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland; Mikrowaage: XS3DU, Mettler Toledo, Columbus, USA, genutzt für die DSC-Messung; Mikrowaage: Sartorius MC5, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland, genutzt für alle weiteren Einwaagen.

Lösungsmittel

Es wurden ungetrocknete Lösemittel verwendet, sofern dies nicht anders bezeichnet wurde.

Die Trocknung der folgenden Lösemittel wurde wie folgt durchgeführt:

Dichlormethan: 1 L DCM wurde mit wasserfreiem Phosphor(V)oxid (25 g) versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schwenken stehen gelassen. Nach Dekantieren wurde das Lösungsmittel mit neuem Phosphor(V)oxid (25 g) refluxiert und mit Hilfe eines Liebig-Kühlers abdestilliert. Das getrocknete DCM wurde schließlich über einem Molekularsieb der Größe 3 Å gelagert sowie mit Parafilm um die Verschlusskappe vor Luftfeuchtigkeit zusätzlich geschützt.

Dynamische Differenzkalorimetrie

DSC1 STAR^e System mit SRS5-Sensor, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland. Die Proben wurden in einen Aluminiumtiegel eingewogen und einem Temperaturprogramm von 10 K/min von 25 – 150 °C unterworfen. Der Ofen wurde mit Stickstoff gespült.

Als Referenz wurde ein leerer Aluminiumtiegel verwendet. Die Messwerte wurden gegen die Einwaage normalisiert und mit Hilfe von Origin (Vers. 2018) gegen die Temperatur ausgewertet.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-spektroskopischen Daten erfolgte vom Institut für Organische Chemie in der NMR-Abteilung der TU Braunschweig.

Geräte: Bruker Avance III 400 (^1H -NMR-Messung: 400 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 101 MHz; ^{19}F -NMR: 377 MHz), Bruker Avance IIIHD 500 (^1H -NMR-Messung: 500 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 126 MHz, ^{19}F -NMR: 470 MHz), Bruker Avance II 600 (^1H -NMR-Messung: 600 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 150 MHz), Fa. Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland.

Lösungsmittel: $\text{DMSO-}d_6$, CDCl_3 .

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS).

^1H -NMR: Angabe der chemischen Verschiebungen in ppm in Relation zum TMS-Signal. Das Protonenverhältnis wurde über die Integration der Signale erhalten.

^{13}C -NMR: Angabe der chemischen Verschiebungen in ppm in Relation zum TMS-Signal. Mit Hilfe der ^{13}C -DEPT135-Spektren wurden die Signale der ^1H -breitbandenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren zugeordnet. Für Kopplungen zwischen Kohlenstoff- und Fluoratomen wurden außerdem die Kopplungskonstanten angegeben. Der Vermerk „2C“ steht für zwei Kohlenstoffatome, für die aufgrund magnetisch äquivalenter Kerne nur ein Signal erhalten wurde.

Es wurden 2D-Spektren (^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HSQC sowie ^1H , ^{13}C -HMBC) zur Strukturaufklärung genutzt.

Folgende Signalmultiplizitäten sind angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Pentett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett.

Röntgenkristallstrukturanalyse

XTALAB Synergy Diffraktometer mit Hilfe der Spiegel-fokussierten Mo $K\alpha$ -Strahlung. Die Strukturen wurden präzisiert mit dem Programm SHELXL-2017/8, G. M. Sheldrick, Universität Göttingen, Deutschland. Die Röntgenkristallstrukturanalysen wurden von Herrn Prof. Dr. Jones am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

UV-Lampe

UV-Lampe für die Untersuchung der Stabilität von **46f**, Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch, Deutschland. Genutzt wurde die Wellenlänge 366 nm.

Ausgangskemikalien

Die Ausgangsstoffe wurden bezogen von: Acros Organics, Geel, Belgien; Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; Fluorochem, Derbyshire, UK; Enamine, Riga, Lettland. Sie wurden nach Bestätigung der geforderten Reinheit und Identität mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen, wenn nicht anders beschrieben, ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt.

Flüssige Benzaldehyd-Derivate (Benzaldehyd, 3-Fluorbenzaldehyd, 3-Methoxybenzaldehyd und 3-Methylbenzaldehyd) wurden vor Verwendung mit gesättigter Natriumcarbonatlösung gewaschen. Dabei wurden 2 mL Benzaldehyd-Derivat fünfmal mit 10 mL gesättigter Natriumcarbonatlösung extrahiert.

Reagenzien zur DC-Detektion

Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung R7 (Ehrlichs Reagenz)

Dimethylaminobenzaldehyd R (1.0 g) wurde in Salzsäure R (50 mL) gelöst und mit Ethanol 96% R (50 mL) versetzt. Das Reagenz wurde vor Gebrauch frisch hergestellt und unter Lichtausschluss gelagert.

Kaliumpermanganat-Lösung R

Kaliumpermanganat R (3 g) wurde in dest. Wasser (100 mL) gelöst. Das Reagenz wurde vor Gebrauch frisch hergestellt und unter Lichtausschluss gelagert.

10.3 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Synthese der 4-(*N,N*-Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde (**52**)

2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 1 Äquivalent) und Kaliumcarbonat (1.6 Äquivalente) werden in DMF (8-15 mL) gelöst und mit dem entsprechenden Amin (1.5 Äquivalent) versetzt. Der Ansatz wird für 3 h 30 min-14 h 30 min bei 100 °C erhitzt. Schließlich wird dieser auf Eiswasser (20 mL) gegeben, wobei sich ein gelb-bräunlicher Niederschlag bildet, der ggf. durch Säulenchromatographie oder Umkristallisation aufgereinigt wird.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Synthese der 6-Amino-4-aryl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile (**58**)

Ein Gemisch aus Malonsäuredinitril (**60**, 1 Äquivalent), 2-Cyanthioacetamid (**59**, 1 Äquivalent) und dem entsprechenden aromatischen Benzaldehyd (1 Äquivalent) wird in Ethanol (5-30 mL) gelöst. Der Ansatz wird nach Zugabe von Piperidin (50-500 µL) für 3-6 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird unter vermindertem Druck das Gemisch zur Trockne eingeeengt. Das erhaltene braune Öl wird mit Wasser (10 mL), Essigsäure (15 Tropfen) und Dichlormethan (2 mL) versetzt, kräftig geschüttelt und für 15-30 min bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wird abgesaugt und ohne weitere Aufreinigung zur Synthese der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide eingesetzt. Bei fehlender Bildung eines Niederschlages wird mit Dichlormethan (dreimal je 50 mL) extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurden diese Zwischenstufen ohne weitere Aufreinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide (**61**)

Der aromatische Aldehyd (1 Äquivalent) wird in Ethanol (2 mL) gelöst. Anschließend werden 2-Cyanthioacetamid (**59**, 1 Äquivalent) sowie katalytische Mengen Triethylamin (50 µL) hinzugegeben. Der Ansatz wird für 10 min-1 h bei 55 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und das Produkt ggf. säulenchromatographisch aufgereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): Synthese der anellierten Dihydropyridine (**82**)

Die entsprechende Carbonylverbindung (1 Äquivalent) wird in 1,4-Dioxan (1 mL) gelöst und auf 80 °C erwärmt. Anschließend werden katalytische Mengen Piperidin (50 µL) und das jeweilige 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamid (**61**, 1 Äquivalent) portionsweise hinzugegeben. Die vollständige Umsetzung wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum eingeeengt und das Produkt durch Umkristallisation oder Säulenchromatographie aufgereinigt. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung wurden die anellierten Dihydropyridine **82** nicht weiter aufgereinigt und in dieser Form für die Synthese der entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide verwendet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV5): Synthese der aliphatischen Amide (**55**)

Das entsprechende aliphatische Amin (1 Äquivalent) wird in getrocknetem Dichlormethan (8 mL) vorgelegt und mit K₂CO₃ (1.8 Äquivalente) versetzt. Der Rundkolben wird mit Argon überschichtet.

2-Chloracetylchlorid (**57**, 1.5 Äquivalente) wird anschließend in 100 µL Schritten alle 15 min hinzugefügt und der Ansatz wird anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der Ansatz für 1 h 10 min refluxiert. Der Verbrauch der Edukte wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Detektion erfolgt nach Eintauchen der DC-Platten in Ehrlichs-Reagenz oder in eine Kaliumpermanganat-Lösung. Nach beendeter Reaktion und Zugabe von Wasser (15 mL) wird für weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wird das Produkt mit Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wird eine klare Flüssigkeit erhalten, die beim Anreiben mit dem Glasstab auskristallisiert. Ggf. wird mit der angegebenen Fließmittelkombination säulenchromatographisch aufgereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6): Synthese der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide (**46** und **47**) und von 2-{[6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-3,5-dicyanpyridin-2-yl]thio}-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (**89**)

Das entsprechende 4-Aryl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin (**58/82**, 1 Äquivalent) wird in DMF (1-15 mL) gelöst und eine Kaliumhydroxidlösung (10%, 1 Äquivalent) wird zugetropft. Anschließend wird das Acetamid-Derivat (1 Äquivalent) hinzugegeben und für 10-30 min bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wird nochmals Kaliumhydroxidlösung (10%, 1 Äquivalent) zugegeben und solange bei Raumtemperatur (ausschließlich **89**) oder 100 °C gerührt, bis sich dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr nachweisen lässt. Es erfolgt die Zugabe von Eiswasser (20 mL), wobei sich ein gelb-brauner Niederschlag bildet, der abgesaugt und mit viel Wasser, wenig Ethanol 70% und Petrolether nachgewaschen wird. Falls der Niederschlag zu fein zum Abfiltrieren ist, wird mittels Ethylacetat (3 x 75 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Anschließend wird das Produkt säulenchromatographisch oder mittels Umkristallisation aufgereinigt.

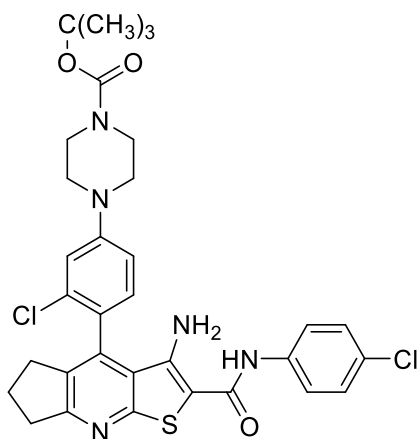
Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): Methode zur Abspaltung von *Boc*-Schutzgruppen zur Synthese von **47r** bzw. **47af**

Unter Argonatmosphäre wird das entsprechende 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47q** bzw. **47x**, 1 Äquivalent) in getrocknetem Dichlormethan (3 – 8 mL) gelöst. Trifluoressigsäure (3 mL) wird hinzugegeben und für 30 min-1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt und der ölige, braune Rückstand wird in Propan-2-ol (3 mL) gelöst. Nach Zugabe einer 5-6 M Lösung von Chlorwasserstoff (1 Äquivalent) in Propan-2-ol fällt ein Niederschlag aus, der abfiltriert wird.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Methode für die Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppe zur Synthese der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46i** und **46j**

Das entsprechende *tert*-Butyl-3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carboxylat (**46g/46h**, 1 Äquivalent) wird in getrocknetem Dichlormethan (2 mL) und Trifluoressigsäure (2 mL) unter Argon-Atmosphäre für 20-24 h bei Raumtemperatur gerührt. Dünnschichtchromatographisch wird die Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppe verfolgt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit Wasser (3 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Danach wird aus Ethanol 70% umkristallisiert.

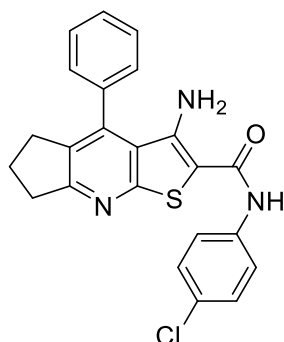
tert-Butyl-4-(4-{3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-4-yl}-3-chlorphenyl)piperazin-1-carboxylat (**46a**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]pyridin-4-yl)phenyl]piperazin-1-carboxylat (**82b**, 462 mg, 0.980 mmol) und 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (200 mg, 0.980 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 506 μ L, 0.980 mmol) in DMF (10 mL) für 1 h bei 100°C. Nach Extraktion des Produkts wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol/Ethylacetat 10:1). Es wurde hellgelbes Pulver (58 mg, 9%) erhalten.

Schmp.: 198 – 200 °C; IR (KBr): 3481 cm^{-1} , 3330 cm^{-1} (NH), 2969 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1701 cm^{-1} (C=O Urethan), 1632 cm^{-1} (C=O Amid); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.44 (s, 9H, CH₃), 2.09 (p, J = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 2.55 – 2.68 (m, 2H, CH₂), 3.04 – 3.16 (m, 2H, CH₂), 3.26 – 3.32 (m, 4H, CH₂), 3.48 (t, J = 5.1 Hz, 4H, CH₂), 5.89 (br s, 2H, NH₂), 7.09 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.20 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.34 – 7.38 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 2H, ArH), 9.56 (s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.0 (3) (CH₃), 22.4, 28.5, 33.8, 46.8 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 1024 Scans nicht detektierbar, mittels HSQC bei 42.9 ppm detektiert), 114.0, 115.0, 122.5 (2C), 128.2 (2C), 130.1 (CH), 79.0, 96.2, 120.7, 122.2, 126.9, 132.2, 133.7, 137.8, 139.2, 147.1, 151.8, 153.8, 158.1, 163.8, 167.2 (C); C₃₂H₃₃Cl₂N₅O₃S (638.61); ber. C 60.19, H 5.21, N 10.97, gef. C 60.22, H 5.01, N 10.81; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 638.2 (100) [M+H]⁺, 538.2 (53) [M-99]⁺, 399.1 (15) [M-238]⁺, 385.2 (42) [M-252]⁺, 239.1 (35) [M-398]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 636.2 (100) [M-H]⁻, 550.2 (6) [M-88]⁻, 536.2 (35) [M-101]⁻, 237.0 (16) [M-400]⁻, HPLC (isokr.): 97.9% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 5.6 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 260 nm, 301 nm, 372 nm; HPLC (grad.): 98.6% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 15.7 min (System 3).

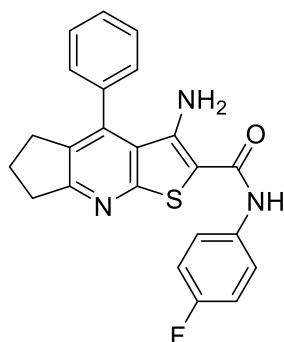
3-Amino-N-(4-chlorphenyl)-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]thieno[3,2-e]pyridin-2-carbamid
(46b)



Nach AAV6 aus 4-Phenyl-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b]pyridin-3-carbonitril (**82d**, 76 mg, 0.30 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (62 mg, 0.30 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 155 μ L, 0.300 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1) wurde gelbes Pulver (59 mg, 47%) erhalten.

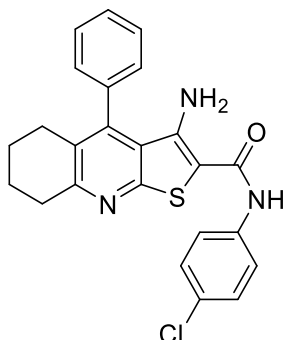
Schmp.: 229 – 230 (Zers.) °C (Lit.: 260 °C³³⁹); IR (KBr): 3477 cm^{-1} , 3327 cm^{-1} (NH), 2954 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1637 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.05 – 2.11 (m, 2H, CH₂), 2.64 – 2.69 (m, 2H, CH₂), 3.09 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 5.85 (br s, 2H, NH₂), 7.33 – 7.37 (m, 2H, ArH), 7.43 – 7.46 (m, 2H, ArH), 7.54 – 7.62 (m, 3H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 2H, ArH), 9.56 (br s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 22.6, 28.7, 33.9 (CH₂), 122.4 (2C), 128.0 (2C), 128.2 (2C), 128.9 (3 C) (mittels HSQC bestätigt) (CH); 96.2, 119.9, 126.9, 132.9, 134.9, 137.8, 141.9, 147.0, 158.2, 163.8, 167.2 (C); C₂₃H₁₈ClN₃OS (419.93); ber. C 65.79, H 4.32, N 10.01, gef. C 65.49, H 4.18, N 9.65; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 420.1 (100) [M+H]⁺, 392.2 (9) [M-28]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%): 418.1 (100) [M-H]⁻, 390.2 (11) [M-30]⁻; HPLC (isokr.): 99.4% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm, *t*_m = 1.2 min, *t*_{ms} = 3.7 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 221 nm, 308 nm, 369 nm; HPLC (grad.): 95.8 % bei 254 nm, *t*_m = 1.0 min, *t*_{ms} = 14.1 min (System 3).

3-Amino-N-(4-fluorphenyl)-4-phenyl-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]thieno[3,2-e]pyridin-2-carbamid
(46c)



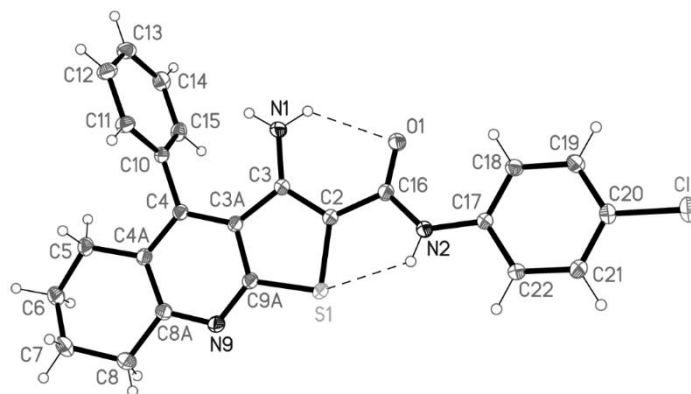
Nach AAV6 aus 4-Phenyl-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b]pyridin-3-carbonitril (**82d**, 94 mg, 0.38 mmol), 2-Chlor-N-(4-fluorphenyl)acetamid (71 mg, 0.38 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 196 μ L, 0.380 mmol) in DMF (1 mL) für 15 min. Nach Extraktion und Umkristallisation aus Ethanol wurden hellgelbe Nadeln (56 mg, 36%) erhalten.

Schmp.: 252 – 255 °C (Zers.); IR (KBr): 3505 cm^{-1} , 3423 cm^{-1} (NH), 1671 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 2.08 (p, J = 7.7 Hz, 2H, CH_2), 2.64 – 2.69 (m, 2H, CH_2), 3.09 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH_2), 5.83 (br s, 2H, NH_2), 7.12 – 7.18 (m, 2H, ArH), 7.43 – 7.47 (m, 2H, ArH), 7.54 – 7.62 (m, 3H, ArH), 7.63 – 7.68 (m, 2H, ArH), 9.51 (s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 22.6, 28.7, 33.9 (CH_2), 114.8 (d, J = 22.1 Hz, 2C, C-C-C-F), 123.0 (d, J = 7.8 Hz, 2C, C-C-C-F), 128.0 (2C), 128.9 (3C) (CH), 96.3, 119.9, 132.9, 134.9, 135.1 (d, J = 2.7 Hz, C-C-C-F), 141.9, 146.8, 158.1 (d, J = 240.0 Hz, C-C-C-F), 158.2, 163.8, 167.0 (C); $^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, H entkoppelt, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = -118.82 (s, 1F); $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{OS}$ (403.48); ber. C 68.47, H 4.50, N 10.41, gef. C 68.66, H 4.45, N 10.38; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 404.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 402.1 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$; HPLC (isokr.): 95.8% bei 254 nm und 97.3% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 4.5 min (ACN/ H_2O 70:30, System 1); λ_{max} : 221 nm, 305 nm, 368 nm; HPLC (grad.): 95.2 % bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 13.2 min (System 3).

3-Amino-N-(4-chlorphenyl)-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]chinolin-2-carbamid (46d)

Nach AAV6 aus 4-Phenyl-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**82e**, 246 mg, 0.924 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (188 mg, 0.921 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 475 μ L, 0.921 mmol) in DMF (2 mL) für 2 h 30 min. Nach Extraktion, säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 4:1) und Umkristallisation aus Ethanol wurden orange Kristalle (35 mg, 9%) erhalten.

Schmp.: 233 – 234 °C; IR (KBr): 3478 cm^{-1} , 3353 cm^{-1} (NH), 2929 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1627 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.66 – 1.71 (m, 2H, CH₂), 1.80 – 1.86 (m, 2H, CH₂), 2.35 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 3.02 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 5.70 (br s, 2H, NH₂), 7.33 – 7.39 (m, 4H, ArH), 7.55 – 7.62 (m, 3H, ArH), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.54 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 22.0, 22.1, 26.2, 33.0 (CH₂), 122.5 (2C), 127.9 (2C), 128.2 (2C), 128.8, 129.1 (2C) (CH); 96.0, 120.5, 126.7, 126.9, 134.9, 137.8, 145.5, 147.0, 156.4, 158.9, 163.9 (C); C₂₄H₂₀ClN₃OS (433.95); ber. C 66.43, H 4.65, N 9.68, gef. C 66.34, H 4.53, N 9.28; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 434.1 (100) [M+H]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 432.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 95.3% bei 254 nm und 97.7% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.4 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 220 nm, 304 nm, 371 nm; HPLC (grad.): 96.3% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 14.7 min (System 3).

Abbildung 10-1: Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d**.Tabelle 10-1: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von Verbindung **46d**.

Summenformel	$C_{24}H_{20}ClN_3OS$	
M_R	433.94	
Temperatur	100(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Monoclinic	
Raumgruppe	P 21/c	
Gitterkonstanten	$a = 11.5984(3)$ Å	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 17.6904(4)$ Å	$\beta = 95.443(3)^\circ$
	$c = 9.7676(3)$ Å	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1995.09(9)$ Å ³	
Z	4	
Dichte (berechnet)	1.445 Mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	0.319 mm ⁻¹	
F(000)	904	
Kristallgröße	$0.25 \times 0.20 \times 0.15$ mm ³	
Θ -Bereich für Datensammlung	2.390 to 36.064°	
Limitierende Indices	$-18 \leq h \leq 18$, $-28 \leq k \leq 28$, $-16 \leq l \leq 15$	
Zahl der Reflexe	98339	
Unabhängige Reflexe	8913 [$R(\text{int}) = 0.0336$]	
Vollständigkeit bis $\Theta = 34.500^\circ$	99.6 %	
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents	
Max. und min. Transmission	1.00000 and 0.87270	
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2	
Daten/ Einschränkungen/ Parameter	8913 / 5 / 292	
Goodness-of-fit on F^2	1.049	

Tabelle 10-2: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von Verbindung **46d** (Fortsetzung).

Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0330, wR2 = 0.0927
R indices (alle Daten)	R1 = 0.0405, wR2 = 0.0965
Größte Peakdifferenz	0.495 und -0.296 e.Å ⁻³
Max. und min. Transmission	1.00000 and 0.87270

Tabelle 10-3: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verteilungsparameter (Å² $\times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d**. U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U^{ij} Tensors. ^{a,b}

	x	y	z	U(eq)
S(1)	6396(1)	3362(1)	5959(1)	17(1)
C(2)	7396(1)	3477(1)	4737(1)	16(1)
C(3)	7642(1)	4227(1)	4481(1)	15(1)
C(3A)	7007(1)	4735(1)	5305(1)	15(1)
C(4)	6988(1)	5530(1)	5395(1)	15(1)
C(4A)	6341(1)	5861(1)	6377(1)	17(1)
C(5)	6319(1)	6710(1)	6555(1)	20(1)
C(6)	5406(1)	7010(1)	7414(1)	22(1)
C(7)	5358(2)	6516(1)	8681(1)	24(1)
C(8)	5023(1)	5705(1)	8302(1)	29(1)
C(6')	5973(3)	6928(2)	8077(3)	19(1)
C(7')	4886(4)	6511(2)	8397(4)	20(1)
C(8A)	5720(1)	5386(1)	7214(1)	18(1)
N(9)	5691(1)	4631(1)	7103(1)	18(1)
C(9A)	6326(1)	4332(1)	6178(1)	16(1)
C(10)	7605(1)	6018(1)	4452(1)	15(1)
C(11)	8643(1)	6380(1)	4906(1)	20(1)
C(12)	9191(1)	6850(1)	4025(1)	22(1)
C(13)	8717(1)	6955(1)	2677(1)	22(1)
C(14)	7693(1)	6592(1)	2218(1)	21(1)
C(15)	7131(1)	6128(1)	3099(1)	19(1)
C(16)	7904(1)	2830(1)	4083(1)	16(1)
C(17)	8126(1)	1424(1)	4392(1)	15(1)

Tabelle 10-4: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verteilungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d** (Fortsetzung). $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U^{ij} Tensors. ^{a,b}

	x	y	z	$U(\text{eq})$
C(18)	8726(1)	1251(1)	3260(1)	17(1)
C(19)	9016(1)	501(1)	3012(1)	18(1)
C(20)	8709(1)	-66(1)	3888(1)	17(1)
C(21)	8096(1)	101(1)	5004(1)	20(1)
C(22)	7803(1)	844(1)	5245(1)	18(1)
Cl(1)	9108(1)	-999(1)	3624(1)	23(1)
O(1)	8375(1)	2892(1)	2998(1)	22(1)
N(1)	8421(1)	4461(1)	3610(1)	21(1)
N(2)	7819(1)	2162(1)	4772(1)	17(1)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-5: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d**. ^{a,b}

S(1)-C(9A)	1.7314(8)	S(1)-C(2)	1.7540(8)
S(1)-C(2)	1.7540(8)	C(2)-C(3)	1.3846(11)
C(2)-C(3)	1.3846(11)	C(10)-C(15)	1.3968(11)
C(3A)-C(4)	1.4087(10)	C(10)-C(11)	1.3982(11)
C(3A)-C(9A)	1.4094(10)	C(11)-C(12)	1.3921(12)
C(4)-C(4A)	1.4012(11)	C(12)-C(13)	1.3898(13)
C(4)-C(10)	1.4937(11)	C(13)-C(14)	1.3876(13)
C(4A)-C(8A)	1.4159(11)	C(14)-C(15)	1.3942(12)
C(4A)-C(5)	1.5122(11)	C(16)-O(1)	1.2415(9)
C(5)-C(6)	1.5083(14)	C(16)-N(2)	1.3680(10)
C(5)-C(6')	1.623(3)	C(17)-C(22)	1.3955(11)
C(6)-C(7)	1.5212(18)	C(17)-C(18)	1.3956(10)
C(7)-C(8)	1.5220(16)	C(17)-N(2)	1.4113(10)
C(8)-C(7')	1.438(4)	C(18)-C(19)	1.3946(11)
C(8)-C(8A)	1.5042(12)	C(19)-C(20)	1.3868(11)
C(6')-C(7')	1.518(5)	C(20)-C(21)	1.3886(11)
C(8A)-N(9)	1.3407(11)	C(20)-Cl(1)	1.7402(8)

Tabelle 10-6: Bindungslängen [Å] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d** (Fortsetzung).^{a,b}

N(9)-C(9A)	1.3290(10)	C(21)-C(22)	1.3836(11)
S(1)-C(9A)	1.7314(8)	S(1)-C(2)	1.7540(8)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-7: Bindungswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d**.^{a,b}

C(9A)-S(1)-C(2)	90.59(4)	C(6)-C(5)-C(4A)	115.73(8)
C(3)-C(2)-C(16)	124.99(7)	C(4A)-C(5)-C(6')	110.48(13)
C(3)-C(2)-S(1)	113.25(6)	C(5)-C(6)-C(7)	109.40(10)
C(16)-C(2)-S(1)	121.76(6)	C(6)-C(7)-C(8)	111.83(10)
N(1)-C(3)-C(2)	124.26(7)	C(7')-C(8)-C(8A)	119.22(16)
N(1)-C(3)-C(3A)	124.02(7)	C(8A)-C(8)-C(7)	112.58(8)
C(2)-C(3)-C(3A)	111.66(7)	C(7')-C(6')-C(5)	110.8(2)
C(4)-C(3A)-C(9A)	117.08(7)	C(8)-C(7')-C(6')	111.7(3)
C(4)-C(3A)-C(3)	131.56(7)	N(9)-C(8A)-C(4A)	123.68(7)
C(9A)-C(3A)-C(3)	111.34(6)	N(9)-C(8A)-C(8)	114.87(7)
C(4A)-C(4)-C(3A)	118.17(7)	C(4A)-C(8A)-C(8)	121.45(7)
C(4A)-C(4)-C(10)	119.97(7)	C(9A)-N(9)-C(8A)	116.17(7)
C(3A)-C(4)-C(10)	121.84(7)	N(9)-C(9A)-C(3A)	125.99(7)
C(4)-C(4A)-C(8A)	118.84(7)	N(9)-C(9A)-S(1)	120.92(6)
C(4)-C(4A)-C(5)	120.64(7)	C(3A)-C(9A)-S(1)	113.09(6)
C(8A)-C(4A)-C(5)	120.52(7)	C(15)-C(10)-C(11)	119.09(7)
C(15)-C(10)-C(4)	119.66(7)	C(22)-C(17)-N(2)	115.75(7)
C(11)-C(10)-C(4)	121.23(7)	C(18)-C(17)-N(2)	124.68(7)
C(12)-C(11)-C(10)	120.50(8)	C(19)-C(18)-C(17)	119.56(7)
C(13)-C(12)-C(11)	120.18(8)	C(20)-C(19)-C(18)	120.02(7)
C(14)-C(13)-C(12)	119.56(8)	C(19)-C(20)-C(21)	120.78(7)
C(13)-C(14)-C(15)	120.64(8)	C(19)-C(20)-Cl(1)	120.49(6)
C(14)-C(15)-C(10)	120.02(8)	C(21)-C(20)-Cl(1)	118.73(6)
O(1)-C(16)-N(2)	123.65(7)	C(22)-C(21)-C(20)	119.15(7)
O(1)-C(16)-C(2)	122.11(7)	C(21)-C(22)-C(17)	120.91(7)
N(2)-C(16)-C(2)	114.24(7)	C(16)-N(2)-C(17)	129.57(7)

Tabelle 10-8: Bindungswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d** (Fortsetzung).^{a,b}

C(22)-C(17)-C(18)	119.56(7)
-------------------	-----------

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-9: Torsionswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d**.^{a,b}

C(9A)-S(1)-C(2)-C(3)	-1.54(6)	C(7')-C(8)-C(8A)-N(9)	-172.7(2)
C(9A)-S(1)-C(2)-C(16)	178.11(7)	C(8A)-N(9)-C(9A)-S(1)	178.31(6)
C(16)-C(2)-C(3)-N(1)	-2.04(13)	C(4)-C(3A)-C(9A)-N(9)	-1.87(12)
S(1)-C(2)-C(3)-N(1)	177.61(7)	C(3)-C(3A)-C(9A)-N(9)	176.55(7)
C(16)-C(2)-C(3)-C(3A)	-179.31(7)	C(4)-C(3A)-C(9A)-S(1)	178.94(5)
S(1)-C(2)-C(3)-C(3A)	0.33(8)	C(3)-C(3A)-C(9A)-S(1)	-2.64(8)
N(1)-C(3)-C(3A)-C(4)	2.28(13)	C(2)-S(1)-C(9A)-N(9)	-176.84(7)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(4)	179.57(8)	C(2)-S(1)-C(9A)-C(3A)	2.39(6)
N(1)-C(3)-C(3A)-C(9A)	-175.83(7)	C(4A)-C(4)-C(10)-C(15)	-101.82(9)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(9A)	1.45(9)	C(3A)-C(4)-C(10)-C(15)	76.41(10)
C(9A)-C(3A)-C(4)-C(4A)	2.78(11)	C(4A)-C(4)-C(10)-C(11)	76.99(10)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(4A)	-175.25(8)	C(3A)-C(4)-C(10)-C(11)	-104.77(9)
C(9A)-C(3A)-C(4)-C(10)	-175.49(7)	C(15)-C(10)-C(11)-C(12)	0.58(12)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(10)	6.49(13)	C(4)-C(10)-C(11)-C(12)	-178.24(8)
C(3A)-C(4)-C(4A)-C(8A)	-1.23(11)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-0.84(13)
C(10)-C(4)-C(4A)-C(8A)	177.07(7)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	0.27(13)
C(3A)-C(4)-C(4A)-C(5)	177.96(7)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	0.54(13)
C(10)-C(4)-C(4A)-C(5)	-3.74(11)	C(13)-C(14)-C(15)-C(10)	-0.80(13)
C(4)-C(4A)-C(5)-C(6)	167.41(8)	C(11)-C(10)-C(15)-C(14)	0.23(12)
C(8A)-C(4A)-C(5)-C(6)	-13.41(12)	C(4)-C(10)-C(15)-C(14)	179.07(7)
C(4)-C(4A)-C(5)-C(6')	-157.34(13)	C(3)-C(2)-C(16)-O(1)	-18.67(13)
C(8A)-C(4A)-C(5)-C(6')	21.84(16)	S(1)-C(2)-C(16)-O(1)	161.72(7)
C(4A)-C(5)-C(6)-C(7)	43.19(13)	C(3)-C(2)-C(16)-N(2)	161.03(8)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-61.73(14)	S(1)-C(2)-C(16)-N(2)	-18.58(10)
C(6)-C(7)-C(8)-C(8A)	48.73(15)	C(22)-C(17)-C(18)-C(19)	-1.24(11)
C(4A)-C(5)-C(6')-C(7')	-50.2(3)	N(2)-C(17)-C(18)-C(19)	177.84(7)
C(8A)-C(8)-C(7')-C(6')	-36.1(4)	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	-0.12(12)

Tabelle 10-10: Torsionswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung **46d** (Fortsetzung).^{a,b}

C(5)-C(6')-C(7')-C(8)	57.6(3)	C(18)-C(19)-C(20)-C(21)	1.11(12)
C(7)-C(8)-C(8A)-N(9)	163.01(10)	C(18)-C(19)-C(20)-Cl(1)	-177.81(6)
C(7')-C(8)-C(8A)-C(4A)	6.6(2)	C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	-0.71(13)
C(7)-C(8)-C(8A)-C(4A)	-17.65(14)	Cl(1)-C(20)-C(21)-C(22)	178.23(6)
C(4A)-C(8A)-N(9)-C(9A)	2.59(12)	C(20)-C(21)-C(22)-C(17)	-0.69(13)
C(8)-C(8A)-N(9)-C(9A)	-178.09(8)	C(18)-C(17)-C(22)-C(21)	1.66(12)
C(8A)-N(9)-C(9A)-C(3A)	-0.82(12)	N(2)-C(17)-C(22)-C(21)	-177.50(8)
C(4)-C(4A)-C(8A)-N(9)	-1.60(12)	O(1)-C(16)-N(2)-C(17)	-5.90(14)
C(5)-C(4A)-C(8A)-N(9)	179.21(8)	C(2)-C(16)-N(2)-C(17)	174.40(7)
C(4)-C(4A)-C(8A)-C(8)	179.12(8)	C(22)-C(17)-N(2)-C(16)	-172.54(8)
C(5)-C(4A)-C(8A)-C(8)	-0.07(12)	C(18)-C(17)-N(2)-C(16)	8.35(13)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

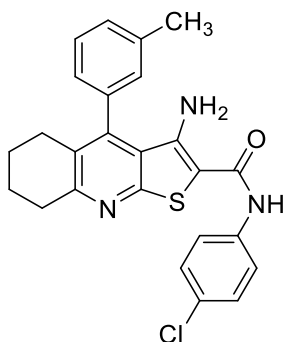
Tabelle 10-11: Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °].^{a,b}

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(01)...O(1)	0.834(16)	2.238(16)	2.8390(10)	129.2(14)
N(2)-H(03)...S(1)	0.861(14)	2.576(14)	2.9901(7)	110.6(10)
N(2)-H(03)...O(1)1	0.861(14)	2.410(14)	3.1571(9)	145.4(12)

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome: 1 x, -y+1/2, z+1/2

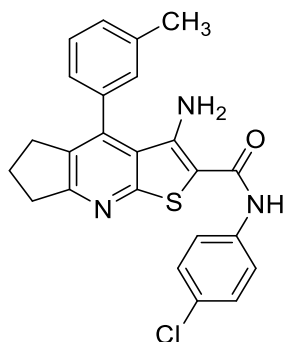
^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

3-Amino-N-(4-chlorphenyl)-4-(3-methylphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b]chinolin-2-carbamid
(46e)



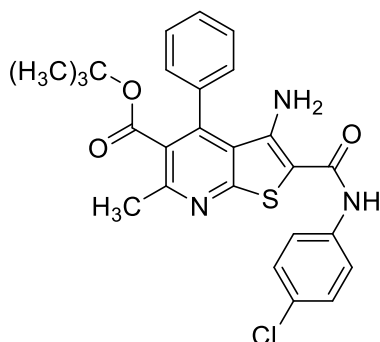
Nach AAV6 aus 2-Thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**82f**, 134 mg, 0.478 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (98 mg, 0.48 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 248 μ L, 0.480 mmol) in DMF (1 mL) bei 100 °C für 2 h 30 min. Nach Extraktion wurde mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 70:30) aufgereinigt. Es wurde hellgelbes Pulver (18 mg, 9%) erhalten.

Schmp.: 241 – 242 °C (Zers.); IR (KBr): 3518 cm^{-1} , 3411 cm^{-1} (NH), 1664 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.65 – 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.79 – 1.87 (m, 2H, CH₂), 2.33 – 2.41 (m, 5H, CH₂ und CH₃), 3.01 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 5.74 (br s, 2H, NH₂), 7.14 – 7.20 (m, 2H, ArH), 7.31 – 7.41 (m, 3H, ArH), 7.49 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.53 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃), 22.0, 22.1, 26.1, 33.0 (CH₂), 122.5 (2C), 124.9, 128.2 (2C), 128.3, 129.0, 129.4 (CH), 95.9, 120.5, 126.7, 126.9, 134.8, 137.8, 138.5, 145.6, 147.1, 156.4, 158.8, 163.9 (C); C₂₅H₂₂ClN₃OS (447.98); ber. C 67.03, H 4.95, N 9.38, gef. C 67.02, H 4.83, N 9.09; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 448.1 (100) [M+H]⁺, 374.2 (11) [M-74]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 446.1 (100) [M-H]⁻, 372.2 (4) [M-76]⁻; HPLC (isokr.): 97.8% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 5.5 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 217 nm, 301 nm, 372 nm; HPLC (grad.): 97.6% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 15.4 min (System 3).

3-Amino-N-(4-chlorphenyl)-4-(3-methylphenyl)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]thieno[3,2-e]pyridin-2-carbamid (46f)

Nach AAV6 aus 2-Thioxo-4-(3-methylphenyl)-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b]pyridin-3-carbonitril (**82g**, 251 mg, 0.942 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (199 mg, 0.975 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 485 μ L, 0.940 mmol) in DMF (1 mL) bei 100 °C für 1 h. Nach Extraktion wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde hellgelbes Pulver (88 mg, 22%) erhalten.

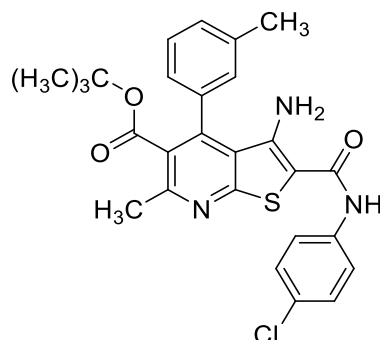
Schmp.: 240 – 242 °C; IR (KBr): 3473 cm^{-1} , 3316 cm^{-1} (NH), 1628 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.07 (p, J = 7.7 Hz, 2H, CH_2), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.67 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH_2), 3.09 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 5.89 (br s, 2H, NH_2), 7.22 – 7.27 (m, 2H, ArH), 7.33 – 7.39 (m, 3H, ArH), 7.48 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 2H, ArH), 9.55 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH_3), 22.6, 28.7, 33.9 (CH_2), 122.4 (2C), 125.0, 128.2 (2C), 128.4, 128.8, 129.5 (CH), 96.1, 119.8, 126.9, 132.8, 134.8, 137.8, 138.3, 142.0, 147.1, 158.2, 163.9, 167.1 (C); $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{OS}$ (433.95); HRMS (ESI) m/z (%) = $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 434.10884, gef. 434.10905 (75), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 456.09078, gef. 456.09101 (30), $[\text{M}+\text{K}]^+$ ber. 472.06472, gef. 472.06492 (5), $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 889.19234, gef. 889.19277 (60); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 434.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 432.1 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$; HPLC (isokr.): 96.1% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.5 min (ACN/ H_2O 80:20, System 1); λ_{max} : 221 nm, 307 nm, 369 nm; HPLC (grad.): 98.4% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 14.7 min (System 3).

tert-Butyl-3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-phenylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carboxylat (46g)

Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-5-cyan-2-methyl-4-phenyl-6-thioxo-1,6-dihydropyridin-3-carboxylat (**82h**, 145 mg, 0.444 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (91 mg, 0.45 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 232 μ L, 0.450 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach Extraktion wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol/Ethylacetat 10:1). Es wurde gelbes Pulver (155 mg, 70%) erhalten.

Schmp.: 180 – 181 °C; IR (KBr): 3470 cm^{-1} , 3325 cm^{-1} (NH), 2976 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1722 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.16 (s, 9H, CH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 5.77 (br s, 2H, NH₂), 7.34 – 7.39 (m, 2H, ArH), 7.40 – 7.44 (m, 2H, ArH), 7.56 – 7.62 (m, 3H, ArH), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.67 (s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 22.4, 27.0 (3C) (CH₃); 122.6 (2C), 128.2 (2C), 128.5 (2C), 128.6 (2C), 129.3 (CH), 82.1, 97.2, 119.6, 127.1, 127.4, 133.3, 137.6, 143.3, 146.9, 154.5, 158.8, 163.6, 165.9; C₂₆H₂₄ClN₃O₃S (494.01); ber. C 63.22, H 4.90, N 8.51, gef. C 63.06, H 4.84, N 8.20; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 494.2 (100) [M+H]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z = 492.2 (100) [M-H]⁻, 390.3 (21) [M-103]⁻; HPLC (isokr.): 98.9% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 4.1 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 221 nm, 205 nm, 371 nm; HPLC (grad.): 96.2% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 14.3 min (System 3).

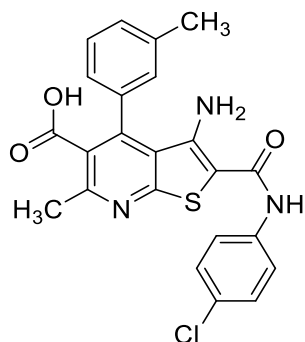
tert-Butyl-3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carboxylat (**46h**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-5-cyan-2-methyl-6-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,6-dihydropyridin-3-carboxylat (**82i**, 134 mg, 0.394 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (82 mg, 0.39 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 201 μ L, 0.390 mmol) in DMF (1 mL) für 15 min bei 100 °C. Nach Extraktion wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol/Ethylacetat 10:1). Es wurde hellgelbes Pulver (100 mg, 52%) erhalten.

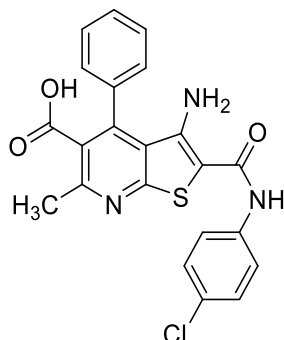
Schmp.: 186 – 193 (Zers.) °C; IR (KBr): 3474 cm^{-1} , 3327 cm^{-1} (NH), 2976 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1725 cm^{-1} , 1632 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.17 (s, 9H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.61 (s, 3H, CH₃), 5.83 (br s, 2H, NH₂), 7.18 – 7.23 (m, 2H, ArH), 7.35 – 7.38 (m, 2H, ArH), 7.39 – 7.42 (m, 1H, ArH), 7.47 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.66 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.8, 22.4, 27.0 (3C) (CH₃), 122.6 (2C), 125.6, 128.2 (2C), 128.4, 129.0, 129.9 (CH), 82.0, 97.0, 119.5, 127.1, 127.4, 133.3, 137.7, 137.9, 143.4, 146.9, 154.5, 158.8, 163.6, 165.9 (C); C₂₇H₂₆ClN₃O₃S (508.03); ber. C 63.83, H 5.16, N 8.27, gef. C 64.02, H 5.19, N 8.10; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 508.2 (100) [M+H]⁺, 359.4 (34) [M-148]⁺, 341.3 (58) [M-166]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 506.2 (63) [M-H]⁻, 390.3 (100) [M-117]⁻; HPLC (isokr.): 97.1% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.9 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 221 nm, 241 nm, 277 nm, 309 nm, 367 nm; HPLC (grad.): 97.6% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 14.9 min (System 3).

3-Amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonsäure (**46i**)



Nach AAV8 aus *tert*-Butyl-3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-(3-methylphenyl)-thieno[2,3-*b*]pyridin-5-carboxylat (**46h**, 40 mg, 0.078 mmol) und Trifluoressigsäure (2 mL) unter Argon-Atmosphäre für 20 h bei Raumtemperatur. Nach Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurden gelbe Nadeln (30 mg, 84%) erhalten.

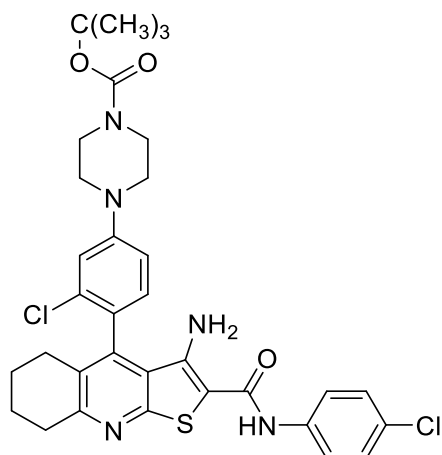
Schmp.: 237 – 240 °C; IR (KBr): 3482 cm⁻¹, 3358 cm⁻¹ (NH), 2925 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2500 cm⁻¹ (br, OH), 1686 cm⁻¹, 1624 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.38 (s, 3H, CH₃), 2.63 (s, 3H, CH₃), 5.79 (br s, 2H, NH₂), 7.20 – 7.25 (m, 2H, ArH), 7.34 – 7.40 (m, 3H, ArH), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.66 (br s, 1H, Amid), 13.35 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 20.9, 22.7 (CH₃), 122.6 (2C), 125.6, 128.2 (2C), 128.4, 128.8, 129.9 (CH), 96.9, 119.5, 127.1, 128.0, 133.5, 137.7, 137.8, 143.0, 147.0, 154.3, 158.5, 163.6, 168.4 (C); C₂₃H₁₈ClN₃O₃S (451.93); HRMS (ESI) *m/z* (%) = [M+H]⁺ ber. 452.08302, gef. 452.08333 (93), [M+Na]⁺ ber. 474.06496, gef. 474.06536 (100), [2M+Na]⁺ ber. 925.14070, gef. 925.14130 (58); MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 452.2 (57) [M+H]⁺, 79.1 (100) [M-373]⁺, 47.2 (100) [M-405]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 450.1 (100) [M-H]⁻, 283.3 (72) [M-168]⁻, 255.2 (68) [M-196]⁻; HPLC (isokr.): 99.0% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 4.8 min (ACN/Puffer 50:50, System 1); λ_{max}: 300 nm, 372 nm; HPLC (grad.): 99.3% bei 254 nm, *t*_m = 1.0 min, *t*_{ms} = 7.1 min (System 3).

3-Amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-phenylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carbonsäure (**46j**)

Nach AAV8 aus *tert*-Butyl-3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methyl-4-phenylthieno[2,3-*b*]pyridin-5-carboxylat (**46g**, 63 mg, 0.13 mmol) und Trifluoressigsäure (3 mL) unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 24 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurden gelbe Nadeln (39 mg, 68%) erhalten.

Schmp.: 260 – 261 °C (Zers.); IR (KBr): 3487 cm⁻¹, 3427 cm⁻¹, 3357 cm⁻¹ (NH), 2443 cm⁻¹ (br, OH), 1681 cm⁻¹, 1625 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.64 (s, 3H, CH₃), 5.76 (br s, 2H, NH₂), 7.34 – 7.38 (m, 2H, ArH), 7.42 – 7.44 (m, 2H, ArH), 7.54 – 7.58 (m, 3H, ArH), 7.67 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.67 (br s, 1H, Amid), 13.36 (br s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 22.7 (CH₃); 122.6 (2C), 128.2 (2C), 128.5 (4C), 129.3 (CH), 97.1, 119.6, 127.1, 128.0, 133.5, 137.7, 142.9, 147.0, 154.3, 158.6, 163.6, 168.4 (C); C₂₂H₁₆ClN₃O₃S (437.90); HRMS (ESI) m/z (%) = [M+H]⁺ ber. 438.06737, gef. 438.06772 (97), [M+Na]⁺ ber. 460.04931, gef. 460.04967 (100), [2M+Na]⁺ ber. 897.10940, gef. 897.10977 (49); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 438.1 (100) [M+H]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 436.1 (100) [M-H]⁻, 392.1 (15) [M-46]⁻; HPLC (isokr.): 97.4% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, t_m = 0.9 min, t_{ms} = 7.9 min (ACN/Puffer 40:60, System 1); λ_{max}: 299 nm, 372 nm; HPLC (grad.): 98.6% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 7.8 min (System 3).

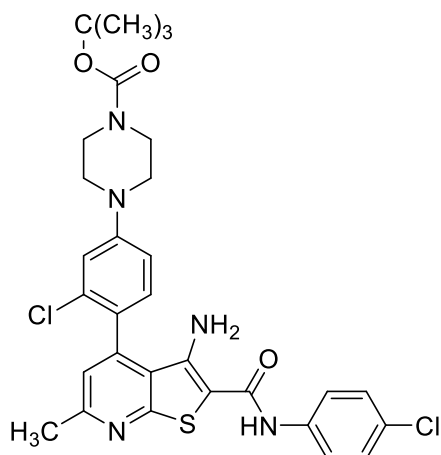
tert-Butyl-4-(4-{3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-*b*]chinolin-4-yl}-3-chlorphenyl)piperazin-1-carboxylat (**46k**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-4-(3-chlor-4-(3-cyan-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-4-yl)phenyl)piperazin-1-carboxylat (**82a**, 260 mg, 0.536 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (110 mg, 0.539 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 281 μ L, 0.544 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach Extraktion wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Petrolether/Ethylacetat 3:1). Es wurde gelbes Pulver (127 mg, 36%) erhalten.

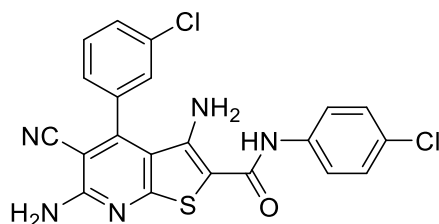
Schmp.: 226 – 228 °C; IR (KBr): 3474 cm^{-1} , 3324 cm^{-1} (NH), 2923 cm^{-1} , 2859 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1660 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.44 (s, 9H, CH₃), 1.65 – 1.75 (m, 2H, CH₂), 1.83 (p, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.25 – 2.42 (m, 2H, CH₂), 2.96 – 3.09 (m, 2H, CH₂), 3.23 – 3.33 (m, 4H, CH₂), 3.42 – 3.54 (m, 4H, CH₂), 5.82 (br s, 2H, NH₂), 7.11 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.21 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.33 – 7.38 (m, 2H, ArH), 7.67 – 7.72 (m, 2H, ArH), 9.53 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.0 (3C) (CH₃); 22.0, 22.0, 25.7, 32.9, 46.9 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 480 Scans nicht detektierbar), 114.0, 115.1, 122.5 (2C), 128.2 (2C), 130.1 (CH), 79.0, 96.2, 121.2, 122.1, 126.9, 127.6, 132.3, 137.8, 142.8, 147.1, 151.8, 153.8, 156.4, 159.0, 163.9 (C); C₃₃H₃₅Cl₂N₅O₃S (652.64); HRMS (ESI) m/z (%) = [M+H]⁺ ber. 652.19104, gef. 652.19134 (47), [M+Na]⁺ ber. 674.17299, gef. 674.17314 (100), [M+K]⁺ ber. 690.14692, gef. 690.14672 (15); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 652.3 (100) [M+H]⁺, 552.1 (15) [M-99]⁺, 447.4 (64) [M-204]⁺, 47.3 (80) [M-605]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 650.3 (100) [M-H]⁻, 550.1 (13) [M-101]⁻; HPLC (isokr.): 95.8% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 6.8 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 262 nm, 299 nm, 373 nm; HPLC (grad.): 96.7% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 15.9 min (System 3).

tert-Butyl-4-(4-{3-amino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-6-methylthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}-3-chlorphenyl)piperazin-1-carboxylat (**46l**)



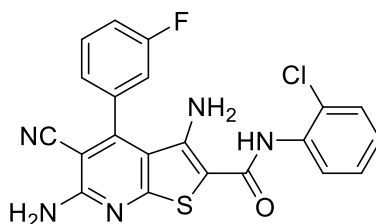
Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-6-methyl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)phenyl]-piperazin-1-carboxylat (**82c**, 439 mg, 0.987 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (201 mg, 0.985 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 511 μ L, 0.990 mmol) in DMF (15 mL) für 2 h bei 100 °C. Anschließend wurde Eiswasser (20 mL) und Ethylacetat (25 mL) hinzugegeben. Das Produkt fiel an der Grenzfläche aus. Es wurde abfiltriert und aus Toluol umkristallisiert. Dabei fällt eine Verunreinigung aus (Lagerung für drei Tage bei 4 °C), die abfiltriert und verworfen wurde. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeeengt. Es wurde hellgelbes Pulver (349 mg, 58%) erhalten.

Schmp.: 238 – 240 °C; IR (KBr): 3478 cm^{-1} , 3325 cm^{-1} (NH), 2968 cm^{-1} , 2912 cm^{-1} , 2862 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1659 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, CH₃), 2.62 (s, 3H, CH₃), 3.27 – 3.31 (m, 4H, CH₂), 3.45 – 3.52 (m, 4H, CH₂), 5.95 (s, 2H, NH₂), 7.06 – 7.10 (m, 2H, ArH), 7.19 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.32 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.34 – 7.38 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.73 (m, 2H, ArH), 9.59 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 23.9, 28.0 (3C) (CH₃), 46.9 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 480 Scans nicht detektierbar), 113.7, 115.0, 121.9, 122.5 (2C), 128.2 (2C), 130.7 (CH), 79.0, 96.2, 120.7, 123.8, 127.0, 132.4, 137.8, 143.8, 147.1, 151.9, 153.8, 159.0, 159.0, 163.8 (C); C₃₀H₃₁Cl₂N₅O₃S (612.57); HRMS (ESI) m/z (%) = [M+H]⁺ ber. 612.15974, gef. 612.15998 (38), [M+Na]⁺ ber. 634.14169, gef. 634.14195 (100), [M+K]⁺ ber. 650.11562, gef. 650.11533 (10); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 612.2 (60) [M+H]⁺, 447.4 (100) [M-164]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 610.2 (100) [M-H]⁻, 446.2 (11) [M-165]⁻; HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.6 min (ACN/H₂O 80:20, System 1); λ_{max} : 218 nm, 259 nm, 298 nm, 270 nm; HPLC (grad.): 96.9% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 14.7 min (System 3).

3,6-Diamino-4-(3-chlorphenyl)-N-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47a**)

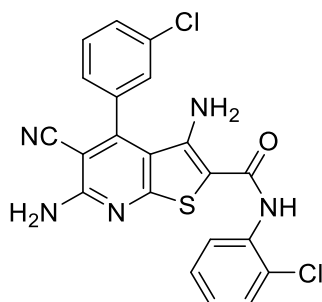
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58b**, 141 mg, 0.492 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (103 mg, 0.505 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 258 μ L, 0.500 mmol) in DMF (1 mL) für 4 h 30 min bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde gelbes Pulver (105 mg, 47%) erhalten.

Schmp.: 280 – 281 °C; IR (KBr): 3455 cm^{-1} , 3402 cm^{-1} , 3331 cm^{-1} , 3288 cm^{-1} (NH), 2212 cm^{-1} (C \equiv N), 1630 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 5.80 (br s, 2H, NH $_2$), 7.32 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.49 (s, 2H, NH $_2$), 7.52 (dt, J = 7.5 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.63 – 7.71 (m, 5H, ArH), 9.43 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ = 122.3 (2C), 126.8, 128.0, 128.2 (2C), 130.0, 130.9 (CH); 90.3, 92.5, 113.5, 115.4, 126.8, 133.6, 135.4, 137.9, 147.5, 150.7, 158.5, 163.5, 163.7 (C); $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{OS}$ (454.33); HRMS (EI): m/z [M] $^{++}$ ber. 453.02124, gef. 453.02118; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 454.2 (11) [M+H] $^+$, 327.2 (26) [M-127] $^+$, 282.3 (100) [M-172] $^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 452.2 (100) [M-H] $^-$; HPLC (isokr.): 97.8% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 5.8 min (ACN/H $_2$ O 60:40, System 1); λ_{max} : 283 nm, 314 nm; HPLC (grad.): 95.7% bei 254 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 12.5 min (System 3).

3,6-Diamino-N-(2-chlorphenyl)-5-cyan-4-(3-fluorphenyl)thieno[2,3-b]pyridin-2-carbamid (**47b**)

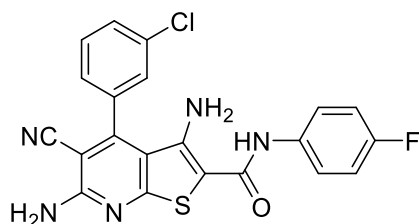
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58c**, 216 mg, 0.800 mmol), 2-Chlor-N-(2-chlorphenyl)acetamid (164 mg, 0.804 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100°C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde oranges Pulver (135 mg, 39%) erhalten.

Schmp.: 255 – 256 °C; IR (KBr): 3454 cm^{-1} , 3385 cm^{-1} , 3318 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 5.71 (br s, 2H, NH₂), 7.24 (td, J = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.34 (td, J = 7.5 Hz, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.38 (ddd, J = 7.8 Hz, 1.5 Hz, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.44 – 7.55 (m, 6H, ArH und NH₂), 7.64 – 7.69 (m, 1H, ArH), 9.10 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 115.6 (d, J = 23.0 Hz, C-C-C-F), 116.9 (d, J = 21.2 Hz, C-C-C-F), 124.3 (d, J = 3.1 Hz, C-C-C-F), 126.9, 127.3, 128.0, 129.3, 131.3 (d, J = 8.8 Hz, C-C-C-F) (CH), 90.2, 92.7, 113.6, 115.4, 129.4, 135.0, 135.6 (d, J = 8.2 Hz, C-C-C-F), 147.2, 150.9, 158.4, 161.9 (d, J = 246.4 Hz, C-C-C-F), 163.4, 163.6 (C); ^{19}F -NMR (377 MHz, H entkoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -110.8 (s, 1F); C₂₁H₁₃ClFN₅OS (437.88); ber. C 57.60, H 2.99, N 15.99, gef. C 57.83, H 2.88, N 15.66; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 438.1 (100) [M+H]⁺, 311.0 (27) [M-126]⁺, 285.0 (12) [M-153]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 436.2 (100) [M-H]⁻, 283.0 (6) [M-155]⁻; HPLC (isokr.): 99.1 % bei 254 nm und 99.1 % bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 4.9 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 281 nm, 310 nm; HPLC (grad.): 95.4% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.2 min (System 3).

3,6-Diamino-N-(2-chlorphenyl)-4-(3-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-b]pyridin-2-carbamid (**47c**)

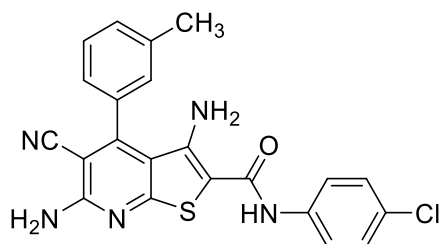
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58b**, 226 mg, 0.788 mmol), 2-Chlor-N-(2-chlorphenyl)acetamid (164 mg, 0.804 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde gelbes Pulver (129 mg, 35%) erhalten.

Schmp.: 254 – 255 °C; IR (KBr): 3454 cm^{-1} , 3386 cm^{-1} , 3340 cm^{-1} (NH), 2143 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 5.70 (br s, 2H, NH₂), 7.24 (td, J = 7.8 Hz, 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.34 (td, J = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.48 – 7.55 (m, 5H, ArH und NH₂), 7.62 – 7.66 (m, 1H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 2H, ArH), 9.12 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 126.8, 126.9, 127.3, 128.0, 128.0, 129.3, 130.0, 130.9 (CH), 90.3, 92.7, 113.6, 115.5, 129.4, 133.6, 135.0, 135.4, 147.2, 150.8, 158.4, 163.4, 163.6 (C); C₂₁H₁₃Cl₂N₅OS (454.33); ber. C 55.52, H 2.88, N 15.42 gef. C 55.51, H 2.85, N 15.07; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 508.2 (6) [M+54]⁺, 486.1 (12) [M+32]⁺, 454.0 (100) [M+H]⁺, 327.0 (23) [M-126]⁺, 301.0 (19) [M-153]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 452.1 (100) [M-H]⁻, 299.0 (10) [M-154]⁻; HPLC (isokr.): 96.6 % bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 6.2 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 283 nm, 315 nm; HPLC (grad.): 97.1% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.7 min (System 3).

3,6-Diamino-4-(3-chlorphenyl)-5-cyan-N-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47d**)

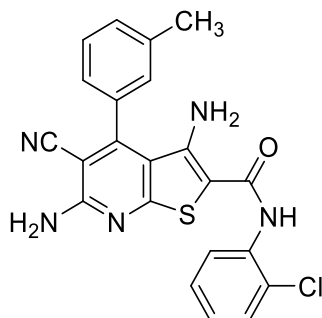
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58b**, 227 mg, 0.792 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (172 mg, 0.917 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Petrolether/Ethylacetat 1.5:1) wurde gelbes Puder (75 mg, 22%) erhalten.

Schmp.: 250 – 251 °C; IR (KBr): 3471 cm^{-1} , 3415 cm^{-1} , 3318 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N), 1638 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 5.77 (br s, 2H, NH₂), 7.09 – 7.16 (m, 2H, ArH), 7.48 (br s, 2H, NH₂), 7.52 (dt, J = 7.7 Hz, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.59 – 7.67 (m, 3H, ArH), 7.68 – 7.71 (m, 2H, ArH), 9.37 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 114.8 (d, J = 22.2 Hz, 2C, C-C-C-F), 122.8 (d, J = 7.8 Hz, 2C, C-C-C-F), 126.8, 128.0, 123.0, 130.9 (CH), 90.3, 92.6, 113.5, 115.5, 133.6, 135.1 (d, J = 2.6 Hz, C-C-C-F), 135.5, 147.3, 150.7, 158.1 (d, J = 239.8 Hz, C-C-C-F), 158.4, 163.5, 163.6 (C); ^{19}F -NMR (377 MHz, H entkoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -118.7 (s, 1F), C₂₁H₁₃ClFN₅OS (437.88); ber. C 57.60, H 2.99, N 15.99, gef. C 57.83, H 3.06, N 15.61; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 438.1 (100) [M+H]⁺, 327.1 (16) [M-110]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 436.1 (100) [M-H]⁻, 299.0 (5) [M-139]⁻, 301.0 (6) [M-137]⁻; HPLC (isokr.): 97.0% bei 254 nm und 97.7% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 3.9 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 283 nm, 317 nm; HPLC (grad.): 98.7% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.6 min (System 3).

3,6-Diamino-*N*-(4-chlorphenyl)-5-cyan-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47e**)

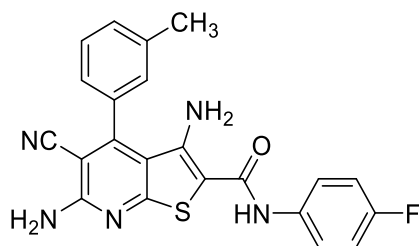
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 218 mg, 0.819 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (161 mg, 0.789 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde oranges Pulver (94 mg, 27%) erhalten.

Schmp.: 255 – 256 °C; IR (KBr): 3473 cm^{-1} , 3362 cm^{-1} , 3307 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.79 (br s, 2H, NH₂), 7.30 – 7.35 (m, 4H, ArH), 7.43 – 7.46 (m, 3H, ArH und NH₂), 7.52 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.64 – 7.70 (m, 2H, ArH), 9.40 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃), 122.3 (2C), 124.9, 128.1 (2C), 128.2, 129.0, 130.6 (CH), 90.2, 92.1, 113.5, 115.5, 126.7, 133.4, 137.9, 138.5, 147.6, 152.5, 158.5, 163.5, 163.6 (C); C₂₂H₁₆ClN₅OS (433.91); ber. C 60.90, H 3.72, N 16.14, gef. C 60.94, H 3.64, N 15.98; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 434.1 (100) [M+H]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 432.1 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 97.4% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 6.0 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 262 nm, 273 nm, 309 nm; HPLC (grad.): 96.9% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.6 min (System 3).

3,6-Diamino-N-(2-chlorphenyl)-5-cyan-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-b]pyridin-2-carbamid (47f)

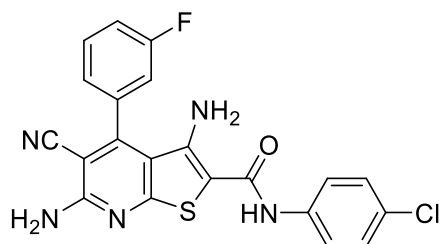
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 231 mg, 0.867 mmol), 2-Chlor-N-(2-chlorphenyl)acetamid (163 mg, 0.799 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden orange Kristalle (147 mg, 42%) erhalten.

Schmp.: 218 – 219 °C; IR (KBr): 3467 cm^{-1} , 3386 cm^{-1} , 3313 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} (C \equiv N), 1633 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.69 (br s, 2H, NH₂), 7.23 (td, J = 7.6 Hz, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.30 – 7.35 (m, 3H, ArH), 7.41 – 7.46 (m, 3H, ArH und NH₂), 7.48 – 7.54 (m, 3H, ArH), 9.07 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃), 124.9, 126.9, 127.3, 127.9, 128.2, 128.9, 129.3, 130.6 (CH), 90.2, 92.4, 113.6, 115.6, 129.2, 133.4, 135.0, 138.5, 147.2, 152.6, 158.5, 163.4, 163.6 (C); C₂₂H₁₆ClN₅OS (433.91); ber. C 60.90, H 3.72, N 16.14, gef. C 60.64, H 3.66, N 15.88; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 488.2 (6) [M+54]⁺, 466.2 (11) [M+32]⁺, 434.1 (100) [M+H]⁺, 307.0 (11) [M-126]⁺, 281.0 (20) [M-152]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 432.1 (100) [M-H]⁻, 279.0 (4) [M-154]⁻; HPLC (isokr.): 98.6% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 6.7 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 282 nm, 313 nm; HPLC (grad.): 95.3% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.8 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-(4-fluorphenyl)-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47g**)

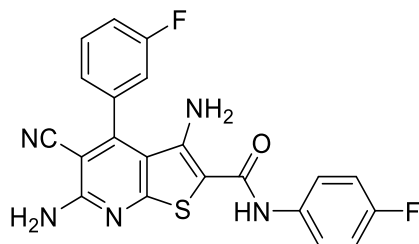
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 214 mg, 0.804 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (153 mg, 0.816 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h 30 min bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde orange-gelbes Pulver (45 mg, 13%) erhalten.

Schmp.: 255 – 256 °C; IR (KBr): 3473 cm^{-1} , 3366 cm^{-1} , 3305 cm^{-1} (NH), 2212 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.76 (br s, 2H, NH₂), 7.09 – 7.16 (m, 2H, ArH), 7.29 – 7.34 (m, 2H, ArH), 7.40 – 7.47 (m, 3H, ArH und NH₂), 7.52 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.58 – 7.67 (m, 2H, ArH), 9.34 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃), 114.8 (d, J = 22.1 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 122.8 (d, J = 7.9 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 124.9, 128.2, 128.9, 130.6 (CH), 90.2, 92.3, 113.6, 115.6, 133.4, 135.2 (d, J = 2.4 Hz, C-C-C-C-F), 138.5, 147.3, 152.5, 158.1 (d, J = 239.8 Hz, C-C-C-C-F), 158.5, 163.5, 163.6 (C); ^{19}F -NMR (377 MHz, H entkoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -119.0 (s, 1F); C₂₂H₁₆FN₅OS (417.46); ber. C 63.30, H 3.86, N 16.78, gef. C 63.08, H 3.80, N 16.45; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 418.1 (100) [M+H]⁺, 307.1 (15) [M-110]⁺, 281.0 (13) [M-136]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 416.2 (100) [M-H]⁻, 279.0 (3) [M-139]⁻; HPLC (isokr.): 98.1% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 4.0 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 221 nm, 260 nm, 274 nm, 308 nm; HPLC (grad.): 96.0% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.8 min (System 3).

3,6-Diamino-N-(4-chlorphenyl)-5-cyan-4-(3-fluorphenyl)thieno[2,3-b]pyridin-2-carbamid (**47h**)

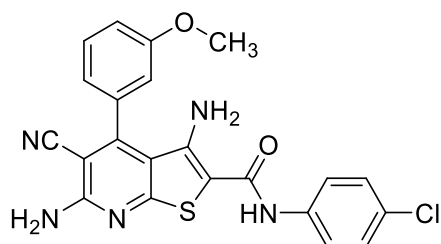
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58c**, 211 mg, 0.781 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (161 mg, 0.789 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 403 μ L, 0.781 mmol) in DMF (1 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1.5:1) wurde oranges Pulver (118 mg, 35%) erhalten.

Schmp.: 255 – 256 °C; IR (KBr): 3463 cm^{-1} , 3414 cm^{-1} , 3296 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 5.81 (br s, 2H, NH₂), 7.32 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.38 (ddd, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.45 – 7.55 (m, 4H, ArH und NH₂), 7.64 – 7.70 (m, 3 H, ArH), 9.42 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 115.4 (d, J = 23.1 Hz; C-C-C-C-F), 117.0 (d, J = 21.3 Hz, C-C-C-C-F), 122.3 (2C), 124.3 (d, J = 2.8 Hz, C-C-C-C-F), 128.1 (2C), 131.3 (d, J = 8.7 Hz, C-C-C-C-F) (CH), 90.3, 92.4, 113.4, 115.4, 126.8, 135.6 (d, J = 8.1 Hz, C-C-C-C-F), 137.9, 147.6, 150.9 (d, J = 1.5 Hz, C-C-C-C-F), 158.5, 161.9 (d, J = 246.4 Hz, C-C-C-C-F), 163.6, 163.7 (C, ein weiteres quartäres C auch nach 1024 Scans nicht detektierbar); ^{19}F -NMR (377 MHz, H entkoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -110.76 (s, 1F); C₂₁H₁₃ClF₅OS (437.88); ber. C 57.60, H 2.99, N 15.99, gef. C 57.89, H 3.11, N 16.03; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 438.0 (84) [M+H]⁺, 47.1 (100) [M-391]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 436.1 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 94.1% bei 254 nm und 93.5% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 4.6 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 222 nm, 238 nm, 273 nm, 309 nm; HPLC (grad.): 96.1% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.1 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-4-(3-fluorphenyl)-N-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47i**)

Nach AAV6 aus Amino-4-(3-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58c**, 252 mg, 0.932 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (164 mg, 0.876 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 449 μ L, 0.870 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1.5:1) wurde oranges Pulver (137 mg, 37%) erhalten.

Schmp.: 257 – 258 °C; IR (KBr): 3464 cm^{-1} , 3414 cm^{-1} , 3306 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1630 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 5.78 (br s, 2H, NH₂), 7.10 – 7.15 (m, 2H, ArH), 7.37 (ddd, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.45 – 7.52 (m, 4H, ArH und NH₂), 7.60 – 7.64 (m, 2H, ArH), 7.64 – 7.69 (m, 1H, ArH), 9.36 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 114.8 (d, J = 22.2 Hz, 2C, C-C-C-F), 115.5 (d, J = 23.0 Hz, C-C-C-F), 116.9 (d, J = 21.1 Hz, C-C-C-F), 122.9 (d, J = 7.7 Hz, 2C, C-C-C-F), 124.3 (d, J = 2.3 Hz, C-C-C-F), 131.4 (d, J = 7.5 Hz, C-C-C-F) (CH), 90.2, 92.5, 113.5, 115.4, 135.1 (d, J = 2.4 Hz, C-C-C-F), 135.6 (d, J = 8.4 Hz, C-C-C-F), 147.3, 150.8, 158.1 (d, J = 240.0 Hz, C-C-C-F), 158.4, 161.9 (d, J = 246.2 Hz, C-C-C-F), 163.5, 163.6 (C); ^{19}F -NMR (471 MHz, H gekoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -118.96 – -119.04 (tt-ähnliches Multiplett, „J” = 8.8 Hz, 5.1 Hz, 1F), -110.74 – -110.86 (td-ähnliches Multiplett, td, J = 9.3 Hz, 6.0 Hz, 1F); C₂₁H₁₃F₂N₅OS (421.43); ber. C 59.85, H 3.11, N 16.62, gef. C 59.60, H 3.16, N 16.52; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 422.1 (100) [M+H]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 420.1 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 98.1% bei 254 nm und 98.0% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 3.2 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 224 nm, 259 nm, 282 nm, 316 nm; HPLC (grad.): 98.9% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.2 min (System 3).

3,6-Diamino-N-(4-chlorphenyl)-5-cyan-4-(3-methoxyphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47j**)

Methode A: 6-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58a**, 123 mg, 0.436 mmol) wurde in DMF (1.5 mL) gelöst. Es wurde 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (88 mg, 0.43 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, 222 μ L, 0.430 mmol) hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde erneut Kaliumhydroxidlösung (10%, 222 μ L, 0.430 mmol) hinzugegeben und für 3 h 10 min auf 100 °C erhitzt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wurde Eiswasser (20 mL) hinzugegeben und der feine Niederschlag wurde mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das braune Öl wurde auf Kieselgel (3 g) aufgezogen und säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat 8:1→3:1) aufgereinigt. Es wurde gelbes Pulver (75 mg, 38%) erhalten, das zusätzlich umkristallisiert wurde. Dabei wurde gelbes Pulver (16 mg, 8%) erhalten, das die geforderte Reinheit aufwies.

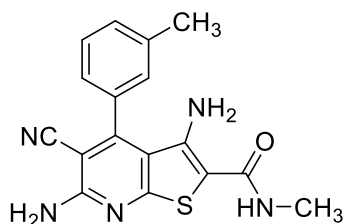
Methode B: 6-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58a**, 134 mg, 0.475 mmol) wurde in Ethanol (2 mL) suspendiert. Es wurde 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (96 mg, 0.47 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, 243 μ L, 0.470 mmol) hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde erneut Kaliumhydroxidlösung (10%, 243 μ L, 0.470 mmol) hinzugegeben und für 50 min refluxiert. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingeeengt, auf Kieselgel (3 g) aufgezogen und das Produkt säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat 8:1→3:1) aufgereinigt. Es wurde gelbes Pulver (127 mg, 59%) erhalten.

Methode C: 2,6-Diamino-4-(3-methoxyphenyl)-4*H*-thiopyran-3,5-dicarbonitril (**81a**, 93 mg, 0.33 mmol) wurde für 24 h in DMF (1 mL) und Kaliumhydroxidlösung (10%, 170 μ L, 0.330 mmol) gelagert. Anschließend wurde 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (68 mg, 0.33 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, 170 μ L, 0.330 mmol) hinzugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde erneut Kaliumhydroxidlösung (10%, 170 μ L, 0.330 mmol) hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Da dünnschichtchromatographisch keine vollständige Zyklisierung beobachtet wurde, wurde für weitere 3 h bei 100 °C gerührt.

Schließlich wurde Eiswasser (20 mL) hinzugegeben und der feine Niederschlag wurde mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel (3 g) aufgezogen und säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Es wurde gelbes Pulver (80 mg, 55%) erhalten.

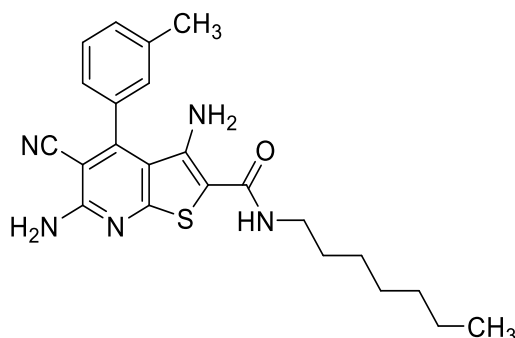
Die quantitativen Bestimmungen (HPLC, Elementaranalyse) wurden mit dem nach Methode A gewonnenen Material durchgeführt.

Schmp.: 270 – 272 °C; IR (KBr): 3455 cm⁻¹, 3411 cm⁻¹, 3321 cm⁻¹(NH), 2214 cm⁻¹ (C≡N), 1632 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 3.82 (s, 3H, CH₃), 5.85 (br s, 2H, NH₂), 7.07 (ddd, *J* = 7.2 Hz, 1.4 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.11 (dd, *J* = 2.4 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.19 (ddd, *J* = 8.3 Hz, 2.7 Hz, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.31 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.45 (br s, 2H, NH₂), 7.55 (dd, *J* = 8.3 Hz, 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.64 – 7.69 (m, 2H, ArH), 9.40 (s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 55.3 (CH₃); 113.4, 115.6, 119.9, 122.3 (2C), 128.1 (2C), 130.4 (CH); 90.3, 92.1, 113.4, 115.5, 126.7, 134.7, 137.9, 147.6, 152.2, 158.5, 159.3, 163.6, 163.5 (C); C₂₂H₁₆ClN₅O₂S (449.91); ber. C 58.73, H 3.58, N 15.57 gef. C 58.59, H 3.42, N 15.21; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 450.2 (10) [M+H]⁺, 79.1 (100) [M-371]⁺, MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 448.3 (100) [M-H]⁻, 293.1 (14) [M-157]⁻; HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 100.0% bei 280 nm, *t_m* = 0.9 min, *t_{ms}* = 4.4 min (ACN/H₂O 40:60, System 3); λ_{max}: 221 nm, 260 nm, 284 nm, 311 nm; HPLC (grad.): 98.6% bei 254 nm, *t_m* = 1.1 min, *t_{ms}* = 11.9 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-methyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47k**)

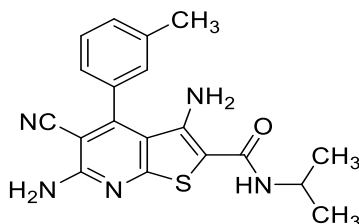
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 529 mg, 1.99 mmol) und 2-Chlor-*N*-methylacetamid (213 mg, 1.99 mmol) mit Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 1.03 mL, 1.99 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 4:1→3:1) und einer Umkristallisation aus Ethanol wurde gelbes Pulver (584 mg, 87%) erhalten.

Schmp.: 272 °C; IR (KBr): 3470 cm⁻¹, 3427 cm⁻¹, 3301 cm⁻¹(NH), 2214 cm⁻¹ (C≡N), 1630 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, CH₃), 5.57 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.27 – 7.32 (m, 4H, ArH und NH₂, da für 2H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.41 – 7.43 (m, 1H, ArH), 7.45 – 7.51 (m, 2H, ArH und Amid, da für 1H Signallöschung bei H/D-Tausch); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 20.9, 25.8 (CH₃); 125.0, 128.2, 128.8, 130.4 (CH); 89.9, 93.3, 114.0, 115.7, 133.6, 138.3, 145.3, 152.1, 158.3, 163.0, 165.1 (C); C₁₇H₁₅N₅OS (337.40), ber. C 60.52, H 4.48, N 20.76, gef. C 60.62, H 4.42, N 20.65; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 392.2 (13) [M+55]⁺, 370.2 (7) [M-33]⁺, 338.2 (100) [M+H]⁺, 307.1 (35) [M-31]⁺, 281.0 (7) [M-56]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 336.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 92.4% bei 254 nm und 97.4% bei 280 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 4.4 min (ACN/H₂O 40:60, System 1); λ_{max}: 279 nm, 309 nm; HPLC (grad.): 95.4 % bei 254 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 9.5 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-heptyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (47l)

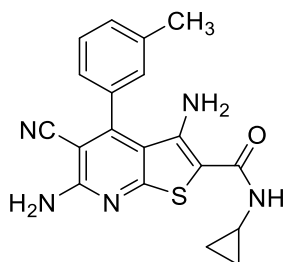
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 415 mg, 3.46 mmol) und 2-Chlor-*N*-heptylacetamid (**55a**, 664 mg, 3.46 mmol) in DMF (2 mL) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 1.79 mL, 3.46 mmol) für 5 h bei 100 °C. Nach Extraktion wurde der ölige Rückstand auf Kieselgel (3 g) aufgezogen und säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat 5:1) sowie mit Hilfe einer Umkristallisation aus Ethanol (70%) aufgereinigt. Es wurde gelbes Pulver (408 mg, 28%) erhalten.

Schmp.: 58 °C, 94 °C, 126 °C (Onset-Temperaturen, mittels DSC determiniert); IR (KBr): 3471 cm⁻¹, 3399 cm⁻¹, 3303 cm⁻¹(NH), 2925 cm⁻¹, 2854 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2213 cm⁻¹ (C≡N), 1625 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 0.82 – 0.88 (m, 3H, CH₃), 1.19 – 1.30 (m, 8H, CH₂), 1.44 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.11 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂), 5.57 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.26 – 7.38 (m, 4H, ArH und NH₂, da für 2H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.40 – 7.45 (m, 1H, ArH), 7.46 – 7.55 (m, 2H, ArH und Amid, da für 1H Signallöschung bei H/D-Tausch); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 13.9, 20.9 (CH₃); 22.0, 26.3, 28.4, 29.3, 31.1, 38.6 (CH₂); 124.9, 128.2, 128.8, 130.4 (CH); 89.9, 93.3, 114.0, 115.7, 133.6, 138.3, 145.4, 152.1, 158.2, 163.1, 164.5 (C); C₂₃H₂₇N₅OS (421.56), ber. C 65.53, H 6.46, N 16.61, gef. C 65.55, H 6.48, N 16.45; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 422.2 (100) [M+H]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 420.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 95.6% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 5.8 min (ACN/H₂O 65:35, System 1); λ_{max}: 251 nm, 291 nm, 343 nm; HPLC (grad.): 98.2% bei 254 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 11.8 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-isopropyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47m**)

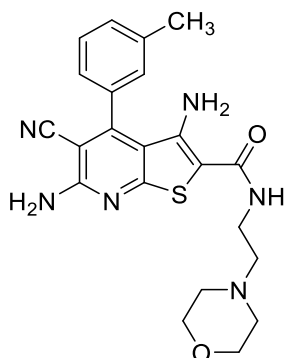
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 376 mg, 1.41 mmol) und 2-Chlor-*N*-isopropylacetamid (**55b**, 192 mg, 1.41 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 728 μ L, 1.41 mmol) in DMF (10 mL) für 6 h bei 100 °C. Nach Extraktion wurde das Produkt säulenchromatographisch (Toluol/Propan-2-ol 10:1) aufgereinigt. Eine anschließende Umkristallisation aus Toluol erbrachte orange Kristalle (84 mg, 16%).

Schmp.: 255 – 257 °C; IR (KBr): 3470 cm^{-1} , 3355 cm^{-1} , 3306 cm^{-1} (NH), 2968 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2206 cm^{-1} (C \equiv N), 1620 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.10 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.96 – 4.07 (m, 1H, CH), 5.59 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.22 – 7.36 (m, 5H, ArH, NH₂ und Amid, da für 3H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.40 – 7.44 (m, 1H, ArH), 7.49 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9, 22.2, 22.2 (CH₃); 40.4, 125.0, 128.2, 128.8, 130.4 (CH); 89.9, 93.4, 114.0, 115.7, 133.6, 138.3, 145.5, 152.1, 158.2, 163.1, 163.9; C₁₉H₁₉N₅OS (365.46), ber. C 62.45, H 5.24, N 19.16, gef. C 62.59, H 5.31, N 18.95; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 366.3 (38) [M+H]⁺, 307.2 (100) [M-58]⁺, 281.2 (64) [M-84]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 364.3 (100) [M-H]⁻, 279.1 (13) [M-86]⁻; HPLC (isokr.): 95.1% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 4.5 min (ACN/H₂O 50:50, System 1); λ_{max} : 221 nm, 242 nm, 271 nm, 302 nm, 324 nm; HPLC (grad.): 98.9% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 10.2 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-cyclopropyl-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (47n)

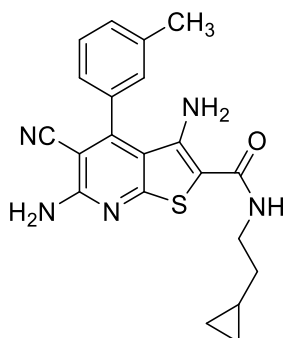
Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 346 mg, 1.30 mmol) und 2-Chlor-*N*-isopropylacetamid (**55c**, 265 mg, 1.30 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 671 μ L, 1.30 mmol) in DMF (10 mL) für 3 h 30 min bei 100 °C. Nach Extraktion wurde das Produkt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 10:1) aufgereinigt. Eine anschließende Umkristallisation aus Ethanol erbrachte gelbes Pulver (73 mg, 15%).

Schmp.: 132 °C, 171 °C, 242 °C (Onset-Temperaturen mittels DSC bestimmt); IR (KBr): 3470 cm^{-1} , 3309 cm^{-1} , (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 0.48 – 0.53 (m, 2H, CH₂), 0.58 – 0.63 (m, 2H, CH₂), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.66 – 2.72 (m, 1H, CH), 5.62 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.25 – 7.39 (m, 4H, ArH und NH₂, da für 2H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.40 – 7.45 (m, 1H, ArH), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, J = 3.8 Hz, 1H, Amid, Signallöschung bei H/D-Tausch); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃, mittels HSQC ermittelt), 5.7 (2C) (CH₂); 22.7, 124.9, 128.2, 128.8, 130.4 (CH); 89.9, 93.0, 113.8, 115.7, 133.6, 138.3, 145.6, 152.1, 158.3, 163.2, 166.0 (C); C₁₉H₁₇N₅OS (363.44), ber. C 62.79, H 4.71, N 19.27, gef. C 62.60, H 4.63, N 19.00; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 364.2 (100) [M+H]⁺, 307.1 (58) [M-56]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 362.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 96.2% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 3.2 min (ACN/H₂O 50:50, System 1); λ_{max} : 280 nm, 309 nm; HPLC (grad.): 97.9% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 10.0 min (System 3).

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-(2-morpholinoethyl)-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47o**)

Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 609 mg, 2.29 mmol) und 2-Chlor-*N*-(2-morpholinoethyl)acetamid (**55e**, 473 mg, 2.29 mmol und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 1.18 mL, 2.29 mmol)) in DMF (10 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach Extraktion wurde das Produkt säulenchromatographisch (Ethylacetat/Ethanol 10:1→4:1) aufgereinigt. Eine anschließende Umkristallisation aus Ethanol erbrachte gelbes Pulver (379 mg, 38%).

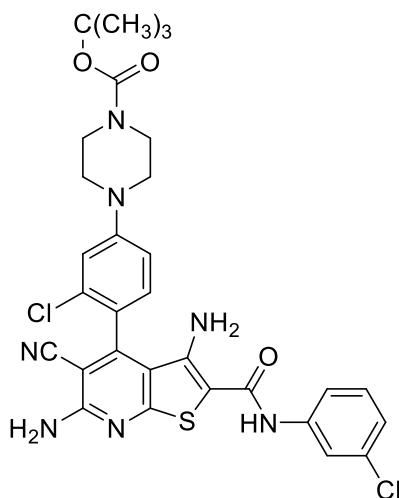
Schmp.: 246 – 249 °C (Zers.); IR (KBr): 3464 cm⁻¹, 3322 cm⁻¹ (NH), 2951 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2206 cm⁻¹ (C≡N), 1621 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.33 – 2.43 (m, 9H, CH₃ und 3 CH₂), 3.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.55 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H, 2 CH₂), 5.57 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.25 – 7.39 (m, 4H, ArH und NH₂, da für 2H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.40 – 7.53 (m, 3H, ArH und Amid, da für 1H Signallöschung bei H/D-Tausch); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 20.9 (CH₃); 36.0, 53.2 (2C), 57.4, 66.1 (2C) (CH₂); 124.9, 128.2, 128.8, 130.5 (CH), 89.9, 93.1, 114.0, 115.7, 133.5, 138.3, 145.5, 152.2, 158.3, 163.0, 164.5 (C); C₂₂H₂₄N₆O₂S (436.53), ber. C 60.53, H 5.54, N 19.25, gef. C 60.67, H 5.62, N 19.14; (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 437.2 (100) [M+H]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 435.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.; RP18 endcapped): 98.6% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm, *t*_m = 1.8 min, *t*_{ms} = 5.1 min (ACN/Puffer 30:70, System 1); λ_{max}: 280 nm, 309 nm.

3,6-Diamino-5-cyan-*N*-(2-cyclopropylethyl)-4-(3-methylphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47p**)

Nach AAV6 aus 6-Amino-2-thioxo-4-(3-methylphenyl)-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**, 451 mg, 1.70 mmol) und 2-Chlor-*N*-(2-cyclopropylethyl)acetamid (**55d**, 274 mg, 1.70 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 877 μ L, 1.70 mmol) in DMF (4 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach Extraktion wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat 9:1→4:1) aufgereinigt. Eine anschließende Umkristallisation aus Ethanol erbrachte gelbes Pulver (215 mg, 32%).

Schmp.: 214 – 216 °C (Zers.); IR (KBr): 3476 cm^{-1} , 3417 cm^{-1} , 3292 cm^{-1} (NH), 2211 cm^{-1} (C \equiv N), 1624 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 0.00 – 0.03 (m, 2H, CH₂), 0.35 – 0.40 (m, 2H, CH₂), 0.60 – 0.69 (m, 1H, CH), 1.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.16 – 3.24 (m, 2H, CH₂), 5.57 (br s, 2H, NH₂, Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.26 – 7.35 (m, 4H, ArH und NH₂, da für 2H Signallöschung bei H/D-Tausch), 7.40 – 7.44 (m, 1H, ArH), 7.47 – 7.55 (m, 2H, ArH und Amid, da für 1H Signallöschung bei H/D-Tausch); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.9 (CH₃); 4.0 (2C), 34.2, 38.9 (CH₂); 8.5 (CH, mittels HSQC detektiert), 125.0, 128.2, 128.8, 130.4 (CH); 90.0, 93.4, 114.0, 115.7, 133.6, 138.3, 145.4, 152.1, 158.2, 163.1, 164.5, C₂₁H₂₁N₅OS (391.49), ber. C 64.43, H 5.41, N 17.89, gef. C 64.32, H 5.34, N 17.61; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 392.2 (100) [M+H]⁺, 307.1 (20) [M-84]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 390.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 95.7% bei 254 nm und 95.9% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 6.6 min (ACN/H₂O 50:50, System 1); λ_{max} : 220 nm, 278 nm, 309 nm; HPLC (grad.): 95.7% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.3 min (System 3).

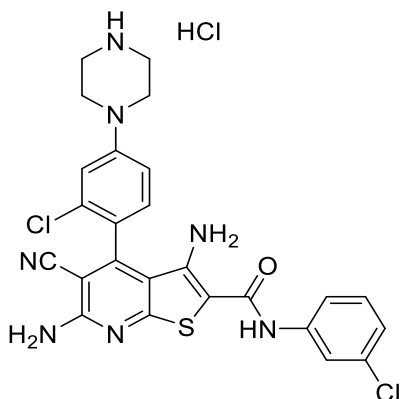
tert-Butyl-4-(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(3-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-b]pyridin-4-yl}-phenyl)piperazin-1-carboxylat (47q)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-4-[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (**58e**, 925 mg, 1.96 mmol) und 2-Brom-3'-chloracetophenon (488 mg, 1.96 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 1.01 mL, 1.96 mmol) in DMF (2.5 mL) für 3 h 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Toluol/Ethylacetat 9:1) wurde gelbes Pulver (120 mg, 10%) erhalten.

Schmp.: 163 – 168 °C (Zers.); IR (KBr): 3480 cm⁻¹, 3314 cm⁻¹ (NH), 2215 cm⁻¹ (C≡N), 1673 cm⁻¹ (C=O), 1629 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.44 (s, 9H, 3 CH₃), 3.32 – 3.37 (m, 4H, 2 CH₂, zur Bestätigung in CDCl₃ vermessen, da es in DMSO mit dem H₂O-Signal überlagert), 3.46 – 3.51 (m, 4H, 2 CH₂), 5.87 (br s, 2H, NH₂), 7.08 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 2.1 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.49 (br s, 2H, NH₂), 7.58 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.82 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 9.43 (s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 28.0 (3C) (CH₃), 46.5 (2C) (CH₂, weiteres Kohlenstoffatom-Signal auch nach 288 Scans nicht detektierbar); 113.7, 114.8, 119.0, 120.1, 122.7, 129.9, 130.3 (CH), 79.0, 91.1, 92.0, 114.2, 115.3, 120.4, 132.1, 132.6, 140.5, 147.8, 149.8, 152.3, 153.8, 158.7, 163.6, 163.7 (C); C₃₀H₂₉Cl₂N₇O₃S (638.57); ber. C 56.43, H 4.58, N 15.35, gef. C 56.44, H 4.58, N 15.21; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 638.2 (9) [M+H]⁺, 582.1 (8) [M-56]⁺, 538.2 (7) [M-100]⁺, 434.1 (26) [M-204]⁺, 385.1 (38) [M-253]⁺, 338.4 (40) [M-300]⁺, 281.0 (9) [M-358]⁺, 47.2 (100) [M-591]⁺, MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 636.3 (72) [M-H]⁻, 536.2 (68) [M-102]⁻, 432.1 (100) [M-206]⁻, 383.1 (66) [M-256]⁻, 369.3 (80) [M-269]⁻; HPLC (isokr.): 90.2% bei 254 nm und 94.0% bei 280 nm, *t*_m = 1.2 min, *t*_{ms} = 4.7 min (ACN/H₂O 70:30, System 1); λ_{max}: 218 nm, 267 nm, 315 nm; HPLC (grad.): 97.2% bei 254 nm, *t*_m = 1.1 min, *t*_{ms} = 13.6 min (System 3).

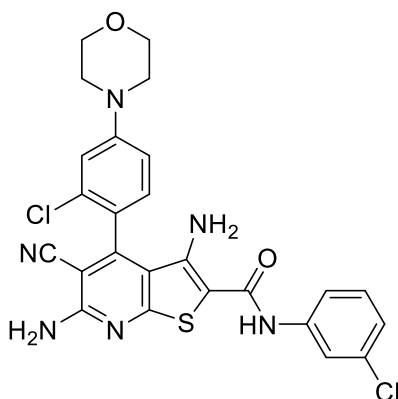
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-(piperazin-1-yl)phenyl)-N-(3-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid Hydrochlorid (**47r**)



Nach AAV7 aus *tert*-Butyl-4-(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(3-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}-phenyl)piperazin-1-carboxylat (**47qf**, 72 mg, 0.11 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL) und Trifluoressigsäure (3 mL) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach anschließender Fällung mit isopropanolischer Chlorwasserstoffsäure (5 – 6 M, 22 µL) wurde ockerfarbenes Pulver (23 mg, 37%) erhalten.

Schmp.: 203 – 204 °C (Zers.); IR (KBr): 3476 cm⁻¹ (NH), 2216 cm⁻¹ (C≡N), 1606 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 3.25 (br s, 4H, 2 CH₂), 3.58 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, 2 CH₂), 5.87 (br s, 2H, NH₂), 7.09 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 2.1 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.18 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.29 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.51 (br s, 2H, NH₂), 7.58 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 2H), 7.82 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.09 (br s, 2H, NH₂⁺), 9.47 (br s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 42.4 (2C), 44.0 (2C) (CH₂), 114.1, 115.4, 119.0, 120.1, 122.7, 129.9, 130.4 (CH), 91.0, 92.2, 114.2, 115.3, 121.4, 132.2, 132.6, 140.5, 147.8, 149.6, 151.6, 158.7, 163.6, 163.7 (C); C₂₅H₂₂Cl₃N₇OS (573.07); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺⁺ ber. 537.08999, gef. 537.08943; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 537.7 (2) [M-HCl+H]⁺, 176.9 (100) [M-396]⁺, MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 535.7 (62) [M-HCl-H]⁻, 297.7 (100) [M-275]⁻, 282.9 (27) [M-290]⁻, 265.7 (37) [M-307]⁻, 254.9 (40) [M-318]⁻; HPLC (isokr.): 95.9% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm, *t*_m = 1.0 min, *t*_{ms} = 6.0 min (ACN/Puffer pH 2.7, 35:65, System 1); λ_{max}: 260 nm, 319 nm.

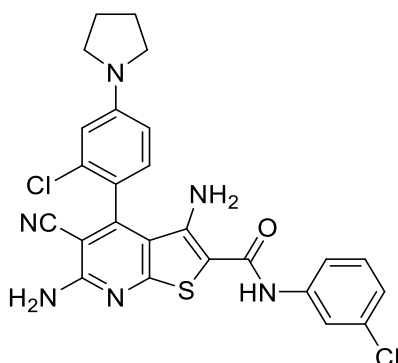
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-N-(3-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carb-
amid (**47s**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58f**, 156 mg, 0.420 mmol), 2-Brom-N-(3-chlorphenyl)acetamid (96 mg, 0.39 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 196 μ L, 0.380 mmol) in DMF (1 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Toluol/Ethylacetat 10:1→3.5:1) wurde gelbes Pulver (73 mg, 36%) erhalten.

Schmp.: 253 – 258 °C (Zers.); IR (KBr): 3480 cm^{-1} , 3387 cm^{-1} , 3313 cm^{-1} (NH), 2957 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2210 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1629 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 3.29 – 3.32 (m, 4H, 2 CH_2), 3.76 (t, J = 4.5 Hz, 4H, CH_2), 5.87 (br s, 2H, NH_2), 7.09 (ddd, J = 8.0 Hz, 2.1 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.48 (br s, 2H, NH_2), 7.58 (ddd, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.82 (t, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.43 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 46.9 (2C), 65.8 (2C) (CH_2), 113.2, 114.4, 119.0, 120.1, 122.7, 129.9, 130.2 (CH), 91.1, 92.0, 114.2, 115.3, 120.6, 132.1, 132.6, 140.5, 147.8, 149.8, 152.7, 158.7, 163.6, 163.7 (C); $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ (539.44); HRMS (EI): m/z [M] $^{+}$ ber. 538.07400, gef. 538.07343; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 539.2 (30) [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$, 386.3 (11) [$\text{M}-154$] $^{+}$, 47.2 (100) [$\text{M}-492$] $^{+}$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 537.2 (4) [$\text{M}-\text{H}$] $^{-}$, 362.2 (100) [$\text{M}-177$] $^{-}$; HPLC (isokr.): 96.2% bei 254 nm und 98.0% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 5.0 min (ACN/ H_2O 60:40, System 1); λ_{max} : 211 nm, 265 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 97.8% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.6 min (System 3).

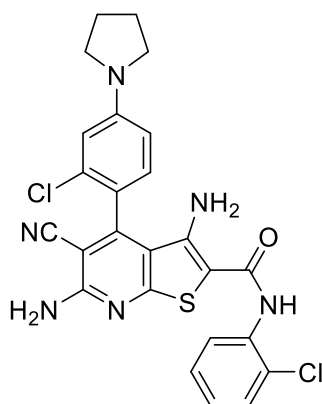
3,6-Diamino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-N-(3-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47t**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58g**, 356 mg, 1.00 mmol), 2-Brom-*N*-(3-chlorphenyl)acetamid (242 mg, 0.974 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 501 μ L, 0.970 mmol) in DMF (1.5 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 10:1→3.5:1) wurde orange-gelbes Pulver (186 mg, 37%) erhalten.

Schmp.: 254 – 256 °C (Zers.); IR (KBr): 3480 cm^{-1} , 3388 cm^{-1} , 3312 cm^{-1} (NH), 2210 cm^{-1} (C \equiv N), 1629 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.96 – 2.02 (m, 4H, CH $_2$), 3.32 – 3.35 (m, 4H, CH $_2$, mittels HSQC bestätigt, da unter H $_2$ O-Signal), 5.93 (br s, 2H, NH $_2$), 6.69 (dd, J = 8.6 Hz, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.77 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.09 (ddd, J = 8.1 Hz, 2.1 Hz, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, J = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.45 (br s, 2H, NH $_2$), 7.58 (ddd, J = 8.2 Hz, 1.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.42 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 24.9 (2C), 47.2 (2C) (CH $_2$), 110.8, 111.4, 119.0, 120.0, 122.6, 129.9, 130.2 (CH), 91.4, 91.8, 114.5, 115.4, 116.7, 131.9, 132.6, 140.5, 148.0, 149.1, 150.4, 158.7, 163.6 (C, ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom-Signal auch nach 384 Scans nicht detektierbar); C $_{25}$ H $_{20}$ Cl $_2$ N $_6$ OS (523.44); HRMS (EI): m/z [M] $^{+*}$ ber. 522.07909, gef. 522.07801; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 523.1 (60) [M+H] $^{+}$, 370.1 (13) [M-153] $^{+}$, 340.1 (63) [M-183] $^{+}$, 295.0 (47) [M-228] $^{+}$, 287.1 (50) [M-236] $^{+}$, 193.9 (56) [M-330] $^{+}$, 47.2 (100) [M-476] $^{+}$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 521.2 (78) [M-H] $^{-}$, 425.2 (30) [M-98] $^{-}$, 330.2 (100) [M-193] $^{-}$, 293.0 (75) [M-230] $^{-}$, 258.0 (30) [M-265] $^{-}$; HPLC (isokr.): 93.7% bei 254 nm und 96.3% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 5.2 min (ACN/H $_2$ O 70:30, System 1); λ_{max} : 204 nm, 216 nm, 271 nm, 316 nm; HPLC (grad.): 95.2% bei 254 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 14.4 min (System 3).

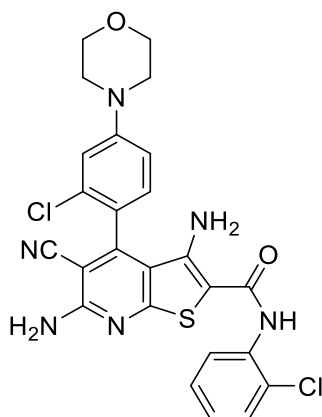
3,6-Diamino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-N-(2-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47u**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58g**, 363 mg, 1.02 mmol), 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)acetamid (208 mg, 1.02 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 526 μ L, 1.02 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 5:1→3:1) wurde gelbes Pulver (103 mg, 19%) erhalten.

Schmp.: 215 – 217 °C (Zers.); IR (KBr): 3467 cm^{-1} , 3448 cm^{-1} , 3385 cm^{-1} , 3313 cm^{-1} (NH), 2218 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1640 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 1.97 – 2.01 (m, 4H, 2 CH_2), 3.30 – 3.34 (m, 4H, 2 CH_2 , mittels HSQC bestätigt, da unter H_2O -Signal), 5.81 (br s, 2H, NH_2), 6.69 (dd, J = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.77 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.24 (td, J = 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.33 (td, J = 7.7 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.43 (br s, 2H, NH_2), 7.51 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.53 (dd, J = 8.1 Hz, 1.6 Hz, 1H), 9.07 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 24.9 (2C), 47.2 (2C) (CH_2), 110.8, 111.3, 126.9, 127.2, 128.0, 129.3, 130.2 (CH), 91.4, 92.2, 114.7, 115.4, 116.8, 129.2, 131.9, 135.1, 147.3, 149.1, 150.3, 158.7, 163.4, 163.5 (C); $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{OS}$ (523.44); ber. C 57.37, H 3.85, N 16.06, gef. C 57.50, H 3.82, N 16.42; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 523.2 (92) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 422.2 (48) $[\text{M}-101]^+$, 370.2 (15) $[\text{M}-153]^+$, 47.2 (100) $[\text{M}-476]^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 521.2 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 420.3 (30) $[\text{M}-103]^-$; HPLC (isokr.): 94.7% bei 254 nm und 96.9% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 5.7 min (ACN/ H_2O 70:30, System 1); λ_{max} : 204 nm, 215 nm, 271 nm, 314 nm; HPLC (grad.): 98.0% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 13.7 min (System 3).

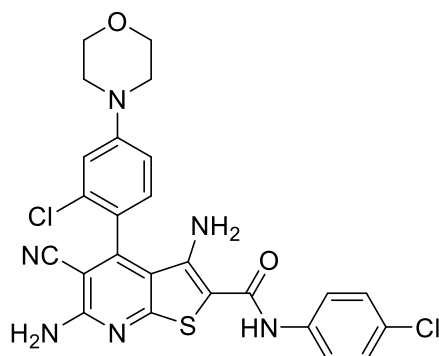
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-N-(2-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47v**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58f**, 374 mg, 1.01 mmol), 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)acetamid (206 mg, 1.01 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 516 μ L, 1.00 mmol) in DMF (1 mL) für 45 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 10:1) wurde gelbes Pulver (174 mg, 32%) erhalten.

Schmp.: 197 – 215 °C (Zers.); IR (KBr): 3460 cm^{-1} , 3451 cm^{-1} , 3387 cm^{-1} , 3310 cm^{-1} (NH), 2221 cm^{-1} (C \equiv N), 1641 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 3.27 – 3.31 (m, 4H, 2 CH $_2$), 3.73 – 3.78 (m, 4H, 2 CH $_2$), 5.76 (br s, 2H, NH $_2$), 7.12 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.22 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.24 (dt, J = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.33 (td, J = 7.6 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.47 (br s, 2H, NH $_2$), 7.49 – 7.53 (m, 1H, ArH), 9.09 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 46.9 (2C), 65.8 (2C) (CH $_2$), 113.2, 114.4, 126.9, 127.3, 128.1, 129.3, 130.3 (CH), 91.0, 92.4, 114.4, 115.3, 120.6, 129.3, 132.1, 135.0, 147.2, 149.8, 152.7, 158.7, 163.4, 163.6 (C); C $_{25}$ H $_{20}$ Cl $_2$ N $_6$ O $_2$ S (539.44); HRMS (EI): m/z [M] $^{++}$ ber. 538.07400, gef. 538.07307; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 539.1 (100) [M+H] $^+$, 444.1 (7) [M-95] $^+$, 423.2 (13) [M-116] $^+$, 412.1 (12) [M-127] $^+$, 400.1 (9) [M-139] $^+$, 386.1 (40) [M-153] $^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 537.2 (100) [M-H] $^-$, 524.2 (5) [M-15] $^-$, 421.2 (9) [M-118] $^-$, 398.1 (7) [M-141] $^-$, 384.1 (15) [M-155] $^-$; HPLC (isokr.): 92.8% bei 254 nm und 95.8% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 5.4 min (ACN/H $_2$ O 60:40, System 1); λ_{max} : 211 nm, 264 nm, 316 nm; HPLC (grad.): 97.8% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 12.2 min (System 3).

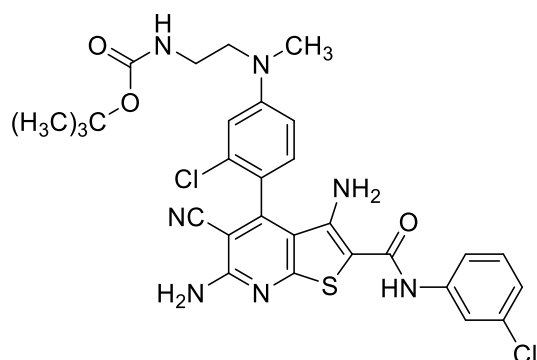
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-N-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47w**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58f**, 282 mg, 0.758 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (151 mg, 0.740 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 377 μ L, 0.730 mmol) in DMF (1 mL) für 45 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 10:1) wurde gelbes Pulver (77 mg, 20%) erhalten.

Schmp.: 277 – 284 °C (Zers.); IR (KBr): 3482 cm^{-1} , 3466 cm^{-1} , 3405 cm^{-1} , 3316 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1631 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 3.28 – 3.33 (m, 4H, 2 CH $_2$), 3.76 (t, J = 4.3 Hz, 4H, 2 CH $_2$), 5.85 (br s, 2H, NH $_2$), 7.12 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.22 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.32 – 7.36 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.46 (br s, 2H, NH $_2$), 7.65 – 7.68 (m, 2H, ArH), 9.40 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 46.9 (2C), 65.8 (2C) (CH $_2$), 113.2, 114.4, 122.4 (2C), 128.1 (2C), 130.2 (CH), 91.0, 92.3, 114.3, 115.3, 120.6, 126.8, 132.1, 137.9, 147.6, 149.8, 152.7, 158.7, 163.5, 163.6 (C); C $_{25}$ H $_{20}$ Cl $_2$ N $_6$ O $_2$ S (539.44); HRMS (EI): m/z [M] $^{+*}$ ber. 538.07400, gef. 538.07277; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 539.1 (13) [M +H] $^+$, 47.2 (100) [M -492] $^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 537.2 (100) [M -H] $^-$, 416.2 (46) [M -123] $^-$, 381.2 (11) [M -158] $^-$; HPLC (isokr.): 94.5% bei 254 nm und 95.1% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.8 min (ACN/H $_2$ O 60:40, System 1); λ_{max} : 214 nm, 265 nm, 318 nm; HPLC (grad.): 97.3% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.2 min (System 3).

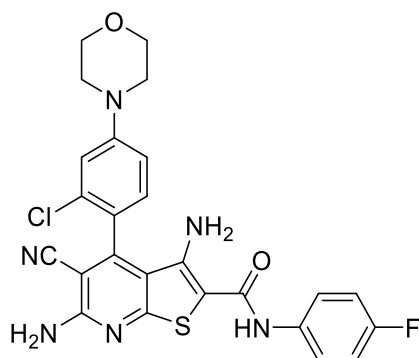
tert-Butyl-{2-[(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(3-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}phenyl)(methyl)amino]ethyl}carbamate (**47x**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-(2-{[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl](methyl)amino}ethyl)carbamate (**58h**, 458 mg, 0.998 mmol), 2-Chlor-*N*-(3-chlorphenyl)acetamid (204 mg, 1.00 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 516 μ L, 1.00 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 5:1) und anschließender Umkristallisation aus Ethanol (70%) wurde gelbes Pulver (154 mg, 25%) erhalten.

Schmp.: 170 – 173 °C (Zers.); IR (KBr): 3478 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} , 3314 cm^{-1} (NH), 2926 cm^{-1} , 2971 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1695 cm^{-1} (C=O), 1635 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.39 (s, 9H, 3 CH₃), 3.01 (s, 3H, CH₃), 3.15 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 5.93 (br s, 2H, NH₂), 6.88 (dd, J = 8.7 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.94 – 7.01 (m, 2H, ArH und NH, da für 1H Signallöschung nach H/D-Tausch), 7.10 (ddd, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.29 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.47 (br s, 2H, NH₂), 7.59 (ddd, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.83 (t, J = 2.1 Hz, 1H, ArH), 9.44 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.2 (3C), 37.9 (CH₃), 36.9, 50.6 (CH₂), 110.5, 111.4, 119.0, 120.1, 122.7, 130.0, 130.2 (CH), 77.7, 91.3, 91.9, 114.5, 115.4, 117.3, 132.1, 132.6, 140.5, 148.0, 150.3, 151.0, 155.7, 158.8, 163.6, 163.7 (C); C₂₉H₂₉Cl₂N₇O₃S (626.56); HRMS (ESI): m/z [M+Na]⁺ ber. 648.13219, gef. 648.13232; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 422.1 (100) [M-205]⁺, 327.1 (8) [M-204]⁺, 311.0 (11) [M-315]⁺, 285.0 (5) [M-341]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 420.1 (100) [M-206]⁻, 325.1 (3) [M-301]⁻, 283.0 (3) [M-343]⁻; HPLC (isokr.): 89.2% bei 254 nm und 93.5% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 3.9 min (ACN/H₂O 70:30, System 1); λ_{max} : 210 nm, 269 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 96.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.9 min (System 3).

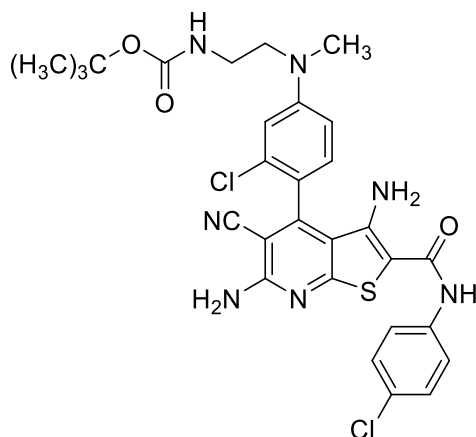
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-5-cyan-*N*-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47y**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58f**, 293 mg, 0.788 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorophenyl)acetamid (148 mg, 0.789 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 408 μ L, 0.790 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat/TEA 5:1:0.05) wurde gelbes Pulver (83 mg, 20%) erhalten.

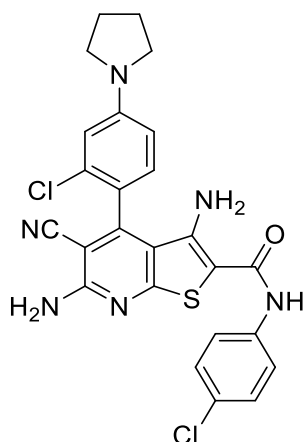
Schmp.: 267 – 277 °C (Zers.); IR (KBr): 3462 cm^{-1} , 3408 cm^{-1} , 3308 cm^{-1} (NH), 2214 cm^{-1} (C \equiv N), 1634 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 3.28 – 3.33 (m, 4H, 2 CH $_2$), 3.73 – 3.79 (m, 4H, 2 CH $_2$), 5.82 (br s, 2H, NH $_2$), 7.09 – 7.15 (m, 3H, ArH), 7.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.39 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.46 (br s, 2H, NH $_2$), 7.59 – 7.64 (m, 2H, ArH), 9.35 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 46.9 (2C), 65.8 (2C) (CH $_2$); 113.2, 114.4, 114.8 (d, J = 22.0 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 122.9 (d, J = 8.0 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 130.2 (CH), 91.0, 92.3, 115.3, 120.6, 132.1, 135.1 (d, J = 2.7 Hz, C-C-C-C-F), 147.3, 149.7, 152.6, 158.1 (d, J = 239.9 Hz, C-C-C-C-F), 158.6, 160.9, 163.5, 163.6 (C); $^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, H gekoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -119.04 (tt-ähnliches Multiplett, „ J “ = 8.8 Hz, 5.1 Hz, 1F); C $_{25}$ H $_{20}$ ClFN $_6$ O $_2$ S (522.98); HRMS (EI): m/z [M] $^{+*}$ ber. 522.10355, gef. 522.10408; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 523.2 (100) [M+H] $^+$, 391.4 (44) [M-132] $^+$, 386.1 (15) [M-137] $^+$, 47.2 (89) [M-476] $^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 521.3 (100) [M-H] $^-$, 384.1 (7) [M-139] $^-$; HPLC (isokr.): 96.2% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 7.0 min (ACN/H $_2$ O 50:50, System 1); λ_{max} : 216 nm, 264 nm, 315 nm; HPLC (grad.): 96.6% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.5 min (System 3).

tert-Butyl-{2-[(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(4-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}phenyl)(methyl)amino]ethyl}carbamate (**47z**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-(2-{[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl](methyl)amino}ethyl)carbamate (**58h**, 317 mg, 0.692 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (141 mg, 0.691 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 356 μ L, 0.690 mmol) in DMF (1 mL) für 45 min bei 100 °C. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Propan-2-ol 5:1) sowie anschließender Umkristallisation aus Ethanol wurde gelbes Pulver (112 mg, 26%) erhalten.

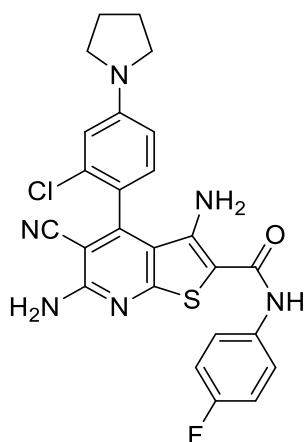
Schmp.: 192 – 195 °C (Zers.); IR (KBr): 3461 cm^{-1} , 3415 cm^{-1} , 3308 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N), 1695 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3 CH₃), 2.99 (s, 3H, CH₃), 3.14 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.46 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 5.88 (br s, 2H, NH₂), 6.87 (dd, J = 8.8 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.92 – 6.98 (m, 2H, ArH und NH, da für 1H Signallöschung nach H/D-Tausch), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.32 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.43 (br s, 2H, NH₂), 7.64 – 7.68 (m, 2H, ArH), 9.39 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.1 (3C), 37.8 (CH₃), 36.9, 50.5 (CH₂), 110.5, 111.3, 122.3 (2C), 128.1 (2C), 130.1 (CH), 77.7, 91.3, 92.0, 114.5, 115.4, 117.3, 126.7, 132.1, 137.9, 147.7, 150.2, 151.0, 155.6, 158.7, 163.6, 163.6 (C); C₂₉H₂₉Cl₂N₇O₃S (626.56); ber. C 55.59, H 4.67, N 15.65, gef. C 55.55, H 4.66, N 15.58; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 626.3 (13) [M+H]⁺, 570.2 (8) [M-56]⁺, 364.2 (58) [M-262]⁺, 307.1 (20) [M-320]⁺, 47.2 (100) [M-579]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 624.3 (31) [M-H]⁻, 390.2 (11) [M-236]⁻, 362.2 (100) [M-264]⁻; HPLC (isokr.): 95.9% bei 254 nm und 97.5% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 3.7 min (ACN/H₂O 70:30, System 1); λ_{max} : 219 nm, 270 nm, 312 nm; HPLC (grad.): 98.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.8 min (System 3).

3,6-Diamino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-N-(4-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-b]pyridin-2-carbamid (**47aa**)

Nach AAV6 aus 6-Amino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58g**, 378 mg, 1.06 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-chlorphenyl)acetamid (217 mg, 1.06 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 547 μ L, 1.06 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h 15 min bei 100 °C. Nach zweifacher säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 2:1) wurde gelbes Pulver (65 mg, 12%) erhalten.

Schmp.: 258 – 262 °C (Zers.); IR (KBr): 3479 cm^{-1} , 3466 cm^{-1} , 3402 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} , 3307 cm^{-1} (NH), 2192 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1630 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 1.97 – 2.05 (m, 4H, 2CH₂), weitere 2 CH₂ mittels HSQC bei 3.33 ppm unter dem H₂O-Peak identifiziert, 5.92 (br s, 2H, NH₂), 6.71 (dd, J = 8.7 Hz, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.78 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.31 (d, J = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.33 – 7.37 (m, 2H, ArH), 7.45 (br s, 2H, NH₂), 7.66 – 7.70 (m, 2H, ArH), 9.41 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 25.1 (2C), 47.3 (2C) (CH₂), 110.9, 111.5, 122.5 (2C), 128.3 (2C), 130.3 (CH), 91.5, 92.1, 114.7, 115.5, 116.9, 126.8, 132.1, 138.1, 147.9, 149.3, 150.4, 158.8, 163.7, 163.7 (C); C₂₅H₂₀Cl₂N₆OS (523.44); ber. C 57.37, H 3.85, N 16.06, gef. C 57.68, H 4.01, N 16.03; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 523.4 (30) [M+H]⁺, 79.2 (100) [M-444]⁺, 47.3 (100) [M-476]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 521.2 (100) [M-H]⁻, 426.2 (35) [M-97]⁻; HPLC (isokr.): 92.5% bei 254 nm und 95.2% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.9 min (ACN/H₂O 70:30, System 1); λ_{max} : 211 nm, 270 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 96.6% bei 254 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 13.3 min (System 3).

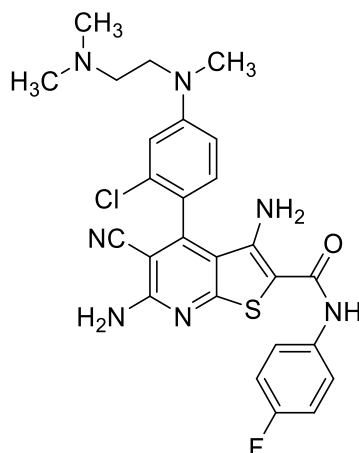
3,6-Diamino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-5-cyan-*N*-(4-fluorphenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47ab**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58g**, 438 mg, 1.23 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (231 mg, 1.23 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 635 μ L, 1.23 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h 15 min bei 100 °C. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 5:2 und Petrolether/Propan-2-ol 5:1) wurde gelbes Pulver (146 mg, 23%) erhalten.

Schmp.: 249 – 252 °C (Zers.); IR (KBr): 3478 cm^{-1} , 3471 cm^{-1} , 3406 cm^{-1} , 3321 cm^{-1} , 3303 cm^{-1} (NH), 2213 cm^{-1} (C \equiv N), 1633 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.97 – 2.02 (m, 4H, 2 CH $_2$), 2 CH $_2$ mittels HSQC bei 3.33 ppm unter dem H $_2$ O-Peak identifiziert, 5.87 (br s, 2H, NH $_2$), 6.69 (dd, J = 8.6 Hz, 2.4 Hz, 1H, ArH), 6.77 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.09 – 7.15 (m, 2H, ArH), 7.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.42 (br s, 2H, NH $_2$), 7.59 – 7.64 (m, 2H, ArH), 9.34 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 24.9 (2C), 47.2 (2C) (CH $_2$), 110.8, 111.4, 114.8 (d, J = 22.2 Hz, 2C, C-C-C-F), 122.9 (d, J = 8.0 Hz, 2C, C-C-C-F), 130.2 (CH), 91.4, 92.1, 114.6, 115.4, 116.8, 131.9, 135.2 (d, J = 2.6 Hz, C-C-C-F), 147.4, 149.1, 150.2, 158.0 (d, J = 239.4 Hz, C-C-C-F), 158.7, 163.5, 163.5 (C); ^{19}F -NMR (377 MHz, H gekoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -119.05 (s, 1F); C $_{25}$ H $_{20}$ ClFN $_6$ OS (506.98); HRMS (EI): m/z [M] $^{+}$ ber. 506.10864, gef. 506.10845; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 507.2 (22) [M+H] $^{+}$, 47.1 (100) [M-460] $^{+}$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 505.2 (100) [M-H] $^{-}$; HPLC (isokr.): 90.9% bei 254 nm und 94.32% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 7.2 min (ACN/H $_2$ O 60:40, System 1); λ_{max} : 211 nm, 270 nm, 317 nm; HPLC (grad.): 97.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.6 min (System 3).

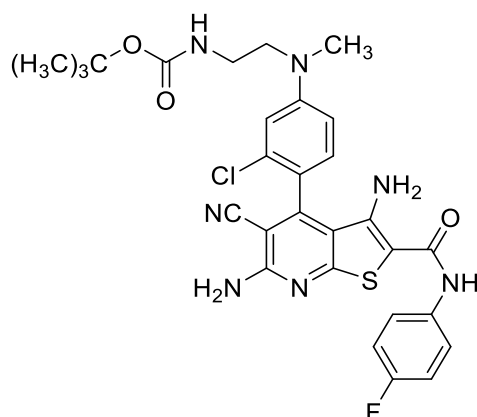
3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)-5-cyan-N-(4-fluorophenyl)thieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47ac**)



Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58i**, 485 mg, 1.25 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorophenyl)acetamid (251 mg, 1.34 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 645 μ L, 1.25 mmol) in DMF (1 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach Extraktion mit Dichlormethan (3 x 50 mL) und säulenchromatographischer Aufreinigung (Methanol/Petrolether/TEA 10:3:0.05 und Ethylacetat/TEA 1:0.05) wurde gelbes Pulver (16 mg, 2%) erhalten.

Schmp.: 190 – 193 °C (Zers.); IR (KBr): 3471 cm^{-1} , 3460 cm^{-1} , 3411 cm^{-1} , 3314 cm^{-1} (NH), 2211 cm^{-1} (C \equiv N), 1634 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.22 (s, 6H, 2 CH₃), 2.44 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.01 (s, 3H, CH₃), 3.48 – 3.54 (m, 2H, CH₂), 5.85 (br s, 2H, NH₂), 6.84 (dd, J = 8.7 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.89 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.09 – 7.17 (m, 2H, ArH), 7.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.43 (br s, 2H, NH₂), 7.59 – 7.65 (m, 2H, ArH), 9.34 (br s, 1H, Amid); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 38.1, 45.5 (2C) (CH₃), 49.5, 55.6 (CH₂), 110.6, 111.4, 114.8 (d, J = 22.3 Hz, 2C, C-C-C-F), 122.8 (d, J = 7.8 Hz, 2C, C-C-C-F), 130.2 (CH), 91.2, 92.2, 114.6, 115.4, 117.3, 132.1, 135.2 (d, J = 2.7 Hz, C-C-C-F), 147.4, 150.1, 150.8, 158.0 (d, J = 240.1 Hz, C-C-C-F), 158.7, 163.5 (C, ein quartäres Kohlenstoff konnte auch nach 2048 Scans nicht detektiert werden); $^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, H gekoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -119.19 – -118.92 (m, 1F); C₂₆H₂₅ClFN₇OS (538.04); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ ber. 538.15866, gef. 538.15893; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 538.2 (44) [M+H]⁺, 338.4 (28) [M-200]⁺, 47.2 (100) [M-491]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 536.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 99.5% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm, t_m = 0.9 min, t_{ms} = 3.7 min (ACN/Puffer 35:65, System 1); λ_{max} : 263 nm, 316 nm.

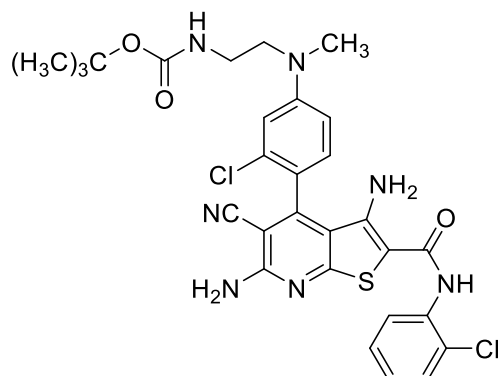
tert-Butyl-{2-[(3-chlor-4-{3,6-diamino-5-cyan-2-[(4-fluorphenyl)carbamoyl]thieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}phenyl)(methyl)amino]ethyl}carbamate (**47ad**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-(2-{[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl](methyl)amino}ethyl)carbamate (**58h**, 517 mg, 1.13 mmol), 2-Chlor-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (213 mg, 1.14 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 583 μ L, 1.13 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Propan-2-ol 5:1 und Toluol/Ethylacetat 5:1) wurde gelbes Pulver (279 mg, 40%) erhalten.

Schmp.: 181 – 184 °C (Zers.); IR (KBr): 3480 cm^{-1} , 3460 cm^{-1} , 3414 cm^{-1} , 3368 cm^{-1} , 3313 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} (C \equiv N), 1695 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3 CH₃), 2.99 (s, 3H, CH₃), 3.13 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.47 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 5.87 (br s, 2H, NH₂), 6.86 (dd, J = 8.8 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.91 – 7.00 (m, 2H, ArH und NH, da für 1H Signallöschung durch H/D-Tausch), 7.09 – 7.17 (m, 2H, ArH), 7.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.44 (br s, 2H, NH₂), 7.58 – 7.64 (m, 2H, ArH), 9.33 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.2 (3C), 37.9 (CH₃), 36.9, 50.6 (CH₂), 110.5, 111.3, 114.8 (d, J = 22.1 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 122.9 (d, J = 7.7 Hz, 2C, C-C-C-C-F), 130.1 (CH), 77.7, 91.2, 92.2, 114.6, 115.4, 117.3, 132.1, 135.2 (d, J = 2.6 Hz, C-C-C-C-F), 147.5, 150.1, 151.0, 155.7, 158.1 (d, J = 240.0 Hz, C-C-C-C-F), 158.7, 163.5, 163.6 (C); ^{19}F -NMR (471 MHz, H gekoppelt, DMSO- d_6) δ (ppm) = -119.03 (s, 1F); C₂₉H₂₉ClFN₇O₃S (610.11); ber. C 57.09, H 4.79, N 16.07, gef. C 57.25, H 4.77, N 15.71; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 610.2 (90) [M+H]⁺, 554.2 (26) [M-55]⁺, 47.1 (100) [M-563]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 608.3 (100) [M-H]⁻, 508.2 (9) [M-101]⁻; HPLC (isokr.): 96.4% bei 254 nm und 97.7% bei 280 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 5.5 min (ACN/H₂O 60:40, System 1); λ_{max} : 217 nm, 269 nm, 314 nm; HPLC (grad.): 97.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.2 min (System 3).

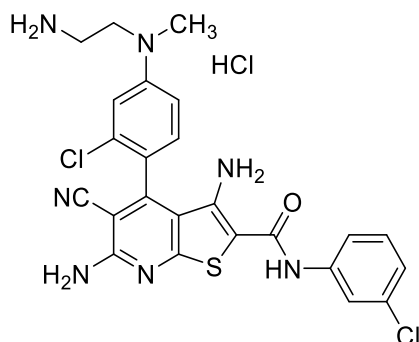
tert-Butyl-{2-[(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(2-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}phenyl)(methyl)amino]ethyl}carbammat (**47ae**)



Nach AAV6 aus *tert*-Butyl-(2-{[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl](methyl)amino}ethyl)carbammat (**58h**, 465 mg, 1.01 mmol), 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)acetamid (211 mg, 1.03 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 521 μ L, 1.01 mmol) in DMF (1 mL) für 2 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 10:1) wurde gelbes Pulver (188 mg, 30%) erhalten.

Schmp.: 203 – 210 °C (Zers.); IR (KBr): 3474 cm^{-1} , 3449 cm^{-1} , 3389 cm^{-1} , 3312 cm^{-1} (NH), 2216 cm^{-1} (C \equiv N), 1700 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, 3 CH₃), 2.99 (s, 3H, CH₃), 3.13 (q, J = 7.3 Hz, 6.8 Hz, 2H, CH₂), 3.45 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 5.79 (br s, 2H, NH₂), 6.86 (dd, J = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.91 – 6.99 (m, 2H, ArH und NH, da für 1H Signallöschung nach H/D-Tausch), 7.24 (td, J = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.34 (td, J = 7.7 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.44 (br s, 2H, NH₂), 7.51 (dd, J = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.53 (dd, J = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H, ArH), 9.06 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.1 (3C), 37.8 (CH₃), 36.9, 50.5 (CH₂), 110.5, 111.3, 126.9, 127.3, 128.0, 129.3, 130.1 (CH), 77.7, 91.2, 92.2, 114.6, 115.4, 117.3, 129.2, 132.1, 135.1, 147.3, 150.2, 151.0, 155.6, 158.7, 163.4, 163.5 (C); C₂₉H₂₉Cl₂N₇O₃S (626.56); ber. C 55.59, H 4.67, N 15.65, gef. C 55.64, H 4.87, N 15.28; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 626.2 (15) [M+H]⁺, 367.0 (43) [M-258]⁺, 335.1 (57) [M-290]⁺, 47.2 (100) [M-579]⁺; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 624.2 (100) [M-H]⁻; HPLC (isokr.): 95.5% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 4.4 min (ACN/H₂O 70:30, System 1); λ_{max} : 269 nm, 316 nm; HPLC (grad.): 98.6% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 13.2 min (System 3).

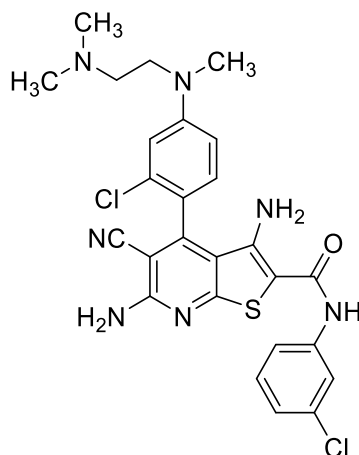
3,6-Diamino-4-{4-[(2-aminoethyl)(methyl)amino]-2-chlorophenyl}-N-(3-chlorophenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid Hydrochlorid (**47af**)



Nach AAV7 aus *tert*-Butyl-{2-[(3-chlor-4-{3,6-diamino-2-[(3-chlorphenyl)carbamoyl]-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-4-yl}phenyl)(methyl)amino]ethyl}carbamate (**47x**, 83 mg, 0.13 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (3 mL) und Trifluoressigsäure (3 mL) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe einer Lösung von Chlorwasserstoff in Propan-2-ol (5 – 6 M, 26 µL) wurde gelbes Pulver (22 mg, 30%) erhalten.

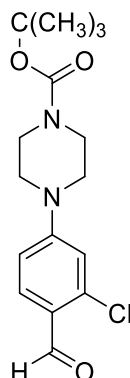
Schmp.: 209 – 215 °C (Zers.); IR (KBr): 3429 cm⁻¹, 3378 cm⁻¹ (NH), 2217 cm⁻¹ (C≡N), 1618 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.99 – 3.07 (m, 5H, CH₃ und CH₂), 3.66 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 5.90 (br s, 2H, NH₂), 6.95 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.10 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.31 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.48 (br s, 2H, NH₂), 7.58 (ddd, *J* = 8.6 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.82 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.96 (br s, 3H, NH₃⁺), 9.45 (br s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 38.0 (CH₃), 35.9, 48.8 (CH₂), 111.1, 112.0, 119.0, 120.1, 122.7, 129.9, 130.3 (CH), 91.2, 92.0, 114.4, 115.4, 118.3, 132.2, 132.6, 140.5, 147.9, 150.0, 150.7, 158.7, 163.7, 163.7 (C); C₂₄H₂₂Cl₃N₇OS (562.90); HRMS (ESI): *m/z* [M-Cl]⁺ ber. 526.09836, gef. 526.09832; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 526.2 (100) [M-35]⁺, 399.1 (10) [M-162]⁺, 373.2 (13) [M-188]⁺, MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 560.2 (7) [M-H]⁻, 524.1 (100) [M-37]⁻; HPLC (isokr.): 97.5% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, *t*_m = 1.0 min, *t*_{ms} = 15.6 min (ACN/Puffer 70:30, System 1); λ_{max}: 263 nm, 319 nm.

3,6-Diamino-4-(2-chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)-N-(3-chlorphenyl)-5-cyanthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamid (**47ag**)



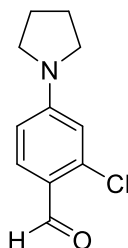
Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(2-chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58i**, 289 mg, 0.749 mmol), 2-Chlor-*N*-(3-chlorphenyl)acetamid (161 mg, 0.789 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (10%, zweimal 387 μ L, 0.750 mmol) in DMF (2 mL) für 30 min bei 100 °C. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol/TEA 10:0.5:0.05, Extraktion mit Ethylacetat (2 x 50 mL) und Umkristallisation aus Ethanol (99.6%) wurde gelbes Pulver (25 mg, 6%) erhalten.

Schmp.: 156 – 159 °C (Zers.); IR (KBr): 3435 cm^{-1} (NH), 2221 cm^{-1} (C \equiv N), 1635 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.21 (s, 6H, 2 CH₃), 2.44 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.01 (s, 3H, CH₃), 3.51 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 5.91 (br s, 2H, NH₂), 6.85 (dd, J = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.90 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.09 (ddd, J = 8.0 Hz, 2.2 Hz, 0.9 Hz, 1H, ArH), 7.29 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.46 (br s, 2H, NH₂), 7.58 (ddd, J = 8.3 Hz, 1.9 Hz, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.82 (t, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 9.42 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 38.1, 45.5 (2C) (CH₃), 49.5, 55.6 (CH₂), 110.6, 111.4, 119.0, 120.0, 122.7, 129.9, 130.2 (CH), 91.3, 91.9, 114.4, 115.4, 117.2, 132.1, 132.6, 140.5, 147.9, 150.2, 150.8, 158.7, 163.6, 163.6 (C); C₂₆H₂₅Cl₂N₇OS (554.49); HRMS (ESI): m/z [M+H]⁺ ber. 554.12911, gef. 554.12958; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 554.2 (100) [M+H]⁺, 401.2 (55) [M-152]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z = 522.2 (100) [M-H]⁻, 399.2 (10) [M-154]⁻; HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 20.8 min (ACN/Puffer 30:70, System 1); λ_{max} : 263 nm, 319 nm.

tert-Butyl-4-(3-chlor-4-formylphenyl)piperazin-1-carboxylat (**52a**)

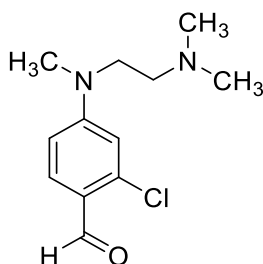
Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 674 mg, 4.25 mmol), *tert*-Butylpiperazin-1-carboxylat (1.19 g, 6.38 mmol) und K_2CO_3 (938 mg, 6.80 mmol) in DMF (15 mL) für 6 h 30 min bei 100 °C. Anschließend wurde Eiswasser (50 mL) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur weiter gerührt. Die Suspension wurde bei 4 °C für 12 h gelagert und anschließend abfiltriert. Der so erhaltene Niederschlag wurde für 8 h bei 40 °C im Vakuum getrocknet. Es wurde hellgelbes Pulver (1.38 g, 100%) erhalten.

Schmp.: 94 – 104 °C (Lit.: 95 – 102 °C²³³); IR (KBr): 1689 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.42 (s, 9H, 3 CH_3), 3.42 – 3.48 (m, 8H, 4 CH_2), 6.97 – 7.00 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 1H, ArH), 10.06 (d, J = 0.6 Hz, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 27.9 (3C) (CH_3), 45.7 (2C, CH_2 , zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 512 Scans nicht detektierbar), 112.1, 113.2, 130.8, 187.1 (CH), 79.1, 121.3, 138.7, 153.7, 154.5 (C); $C_{16}H_{21}ClN_2O_3$ (324.81); ber. C 59.17, H 6.52, N 8.62, gef. C 59.49, H 6.58, N 8.49; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 325.3 (34) $[M+H]^+$, 269.1 (63) $[M-55]^+$, 225.1 (100) $[M-99]^+$; HPLC (grad.): 98.8 % bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.1 min (System 3), λ_{max} : 252 nm, 320 nm.

2-Chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)benzaldehyd (52b)

Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 635 mg, 4.00 mmol), Pyrrolidin (493 μ L, 6.00 mmol) und K_2CO_3 (898 mg, 6.50 mmol) in DMF (10 mL) für 5 h 15 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Petrolether/Ethylacetat 9:1) wurde gelb-oranges Pulver (719 mg, 86%) erhalten.

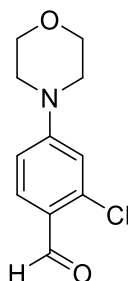
Schmp.: 86 – 91 °C (Lit.: 90 – 92 °C²³³; 78 – 80 °C²⁸¹); IR (KBr): 2978 cm^{-1} , 2958 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} , 2861 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1657 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.94 – 2.00 (m, 4H, 2 CH₂), 3.34 – 3.38 (m, 4H, 2 CH₂), 6.59 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ArH), 6.61 (ddd, J = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 10.02 (d, J = 0.8 Hz, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 24.8 (2C), 47.5 (2C) (CH₂), 110.7, 111.2, 130.7, 186.6 (CH), 119.4, 138.6, 151.8 (C); C₁₁H₁₂ClNO (209.67); ber. C 63.01, H 5.77, N 6.68, gef. C 63.31, H 5.82, N 6.39; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 210.1 (100) [M+H]⁺; HPLC (grad.): 97.7% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 11.7 min (System 3); λ_{max} : 206 nm, 254 nm, 341 nm, 358 nm.

2-Chlor-4-[[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino]benzaldehyd (52c)

Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 686 mg, 4.33 mmol), *N', N', N''*-Trimethylethan-1,2-diamin (840 μ L, 6.52 mmol) und K_2CO_3 (956 mg, 6.93 mmol) in DMF (10 mL) für 5 h 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Ethanol/Triethylamin 1:0.05) wurde hellbraunes Öl (1.04 g, 100%) erhalten.

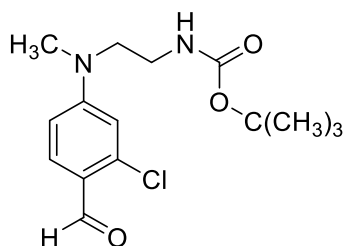
IR (NaCl): 2971 cm^{-1} , 2943 cm^{-1} , 2911 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1668 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.20 (s, 6H, 2 CH₃), 2.41 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 3.05 (s, 3H, CH₃), 3.56 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 6.73 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.79 (ddd, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz, 0.8 Hz, 1H, ArH), 7.68 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 10.04 (d, J = 0.8 Hz, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 38.4, 45.5 (2C) (CH₃); 49.5, 55.7 (CH₂); 110.3, 111.0, 130.7, 186.7 (CH); 119.7, 138.8, 153.6 (C); C₁₂H₁₇ClN₂O (240.73); ber. C 59.87, H 7.12, N 11.64, gef. C 60.07, H 7.34, N 11.38; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 241.2 (100) [M+H]⁺, 196.1 (12) [M-45]⁺; MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 255.2 (80) [M+15]⁻, 239.1 (54) [M-H]⁻, 225.0 (28) [M-16]⁻, 211.1 (36) [M-30]⁻, 168.0 (100) [M-73]⁻; HPLC (isokr.): 99.8% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm, t_m = 1.2 min, t_{ms} = 8.7 min (ACN/Puffer 10:90, System 1); λ_{max} : 255 nm, 326 nm, 352 nm.

2-Chlor-4-morpholinobenzaldehyd (52d)



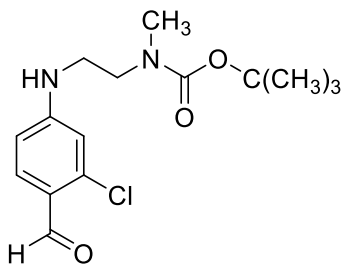
Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 794 mg, 5.01 mmol), Morpholin (650 μL , 7.54 mmol) und K₂CO₃ (1.11 g, 8.01 mmol) in DMF (12 mL) für 6 h 30 min bei 100 °C. Es wurden gelbe Nadeln (923 mg, 82%) erhalten.

Schmp.: 93 – 94 °C (Lit.: 85 – 89 °C²³³, 87 °C²⁸¹); IR (KBr): 2962 cm^{-1} , 2873 cm^{-1} , 2831 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1657 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 3.37 – 3.42 (m, 4H, 2 CH₂), 3.69 – 3.74 (m, 4H, 2 CH₂), 7.00 – 7.03 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 1H, ArH), 10.07 (br s, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 46.2 (2C), 65.6 (2C) (CH₂), 112.0, 113.2, 130.7, 187.2 (CH), 121.6, 138.6, 155.0 (C); C₁₁H₁₂ClNO₂ (225.67); ber. C 58.55, H 5.36, N 6.21, gef. C 58.34, H 5.01, N 6.18; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 226.1 (100) [M+H]⁺; HPLC (grad.): 99.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 9.9 min (System 3); λ_{max} : 204 nm, 252 nm, 326 nm.

tert-Butyl-[2-[(3-chlor-4-formylphenyl)(methyl)amino]ethyl]carbamat (**52e**)

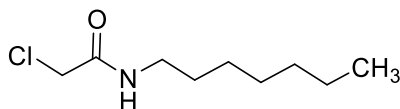
Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 396 mg, 2.50 mmol), *tert*-Butyl-[2-(methylamino)ethyl]carbamate (797 mg, 3.75 mmol) und K_2CO_3 (552 mg, 4.00 mmol) in DMF (8 mL) für 5 h bei 100 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat 2:1) wurde hellgelbes Pulver (750 mg, 95%) erhalten.

Schmp.: 90 – 92 °C (Lit.: 25 – 27 °C²³³); IR (KBr): 3368 cm^{-1} (NH), 3014 cm^{-1} (CH aromatisch), 2989 cm^{-1} , 2967 cm^{-1} , 2903 cm^{-1} , 2856 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1674 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.32 (s, 9H, 3 CH_3), 3.01 (s, 3H, CH_3), 3.11 (q, J = 6.2 Hz, 2H, CH_2), 3.49 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH_2), 6.73 – 6.80 (m, 2H, ArH und NH), 6.92 (t, J = 6.0 Hz, 1H, ArH), 7.64 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 10.02 (d, J = 0.6 Hz, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.0 (3C), 38.0 (CH_3), 37.2, 50.6 (CH_2), 110.3, 111.0, 119.7, 130.6, 186.6 (CH), 77.6, 138.7, 154.0, 155.6 (C); $C_{15}H_{21}ClN_2O_3$ (312.79); ber. C 57.60, H 6.77, N 8.96, gef. C 57.48, H 6.88, N 8.85; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 257.2 (100) $[M-56]^+$, 170.1 (16) $[M-143]^+$, 88.1 (16) $[M-225]^+$; MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 168.0 (100) $[M-145]^-$; HPLC (grad.): 99.7% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.0 min (System 3); λ_{max} : 215 nm, 255 nm, 327 nm, 358 nm.

tert-Butyl-{2-[(3-chlor-4-formylphenyl)amino]ethyl}(methyl)carbamat (**52f**)

Nach AAV1 aus 2-Chlor-4-fluorbenzaldehyd (**48a**, 800 mg, 5.05 mmol) und *tert*-Butyl-(2-aminoethyl)(methyl)carbamate (1.36 mL, 7.58 mmol) in DMF (8 mL) und K_2CO_3 (1.12 g, 8.08 mmol) für 14 h 30 min bei 100 °C. Nach säulenchromatografischer Aufreinigung (Toluol/Ethylacetat/TEA 3:1:0.05) wurde oranges Öl (40 mg, 3%) erhalten. Der aliphatische Bereich im 1H -NMR-Spektrum wies ein Isomeren-Verhältnis von etwa 1:2 auf.

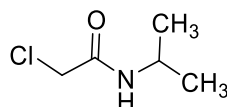
IR(NaCl): 3343 cm^{-1} (NH), 3002 cm^{-1} (CH aromatisch), 2976 cm^{-1} , 2932 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1675 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 1.26 (s, 6H, 2 CH_3), 1.38 (s, 3H, CH_3), 2.77 – 2.85 (m, 3H, CH_3), 3.27 – 3.34 (m, 4H, 2 CH_2), 6.61 – 6.69 (m, 2H, ArH), 7.32 (br s, 1H, NH), 7.60 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 9.99 (br s, 1H, Aldehyd); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 27.8/28.0 (3C), 33.8/34.9 (CH_3), 39.6/40.0, 46.5/47.1 (CH_2), 128.2, 128.9, 186.6 (CH), 78.4, 110.9, 120.1, 125.3, 131.0, 139.0, 154.6 (C, teilweise doppelter Signalsatz durch Rotationsbarriere um C-N-Bindung); $C_{15}H_{21}ClN_2O_3$ (312.79); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 313.3 (3) $[M+H]^+$, 257.2 (100) $[M-56]^+$, 213.1 (68) $[M-100]^+$, 182.1 (21) $[M-131]^+$, 156.1 (16) $[M-157]^+$; MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 311.2 (82) $[M-H]^-$, 180.1 (100) $[M-133]^-$; HPLC (grad.): 99.2% bei 254 nm, t_m = 1.0 min, t_{ms} = 11.1 min (System 3); λ_{max} : 222 nm, 242 nm, 309 nm, 358 nm.

2-Chlor-*N*-heptylacetamid (**55a**)

Nach AAV5 aus Heptan-1-amin (595 μ L, 4.00 mmol), 2-Chloracetylchlorid (**57**, 478 μ L, 6.00 mmol) und K_2CO_3 (994 mg, 7.19 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL). Nach Extraktion wurde farbloses Pulver (767 mg, 100%) erhalten.

Schmp.: 33 – 34 °C; IR (KBr): 3311 cm⁻¹ (NH), 2954 cm⁻¹, 2925 cm⁻¹, 2848 cm⁻¹ (CH aliphatisch); 1672 cm⁻¹, 1643 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 0.83 – 0.89 (m, 3H, CH₃), 1.19 – 1.31 (m, 8H, 4 CH₂), 1.40 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.04 – 3.10 (m, 2H, CH₂), 4.02 (s, 2H, CH₂), 8.18 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, Amid); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 13.9 (CH₃), 21.9, 26.2, 28.3, 28.7, 31.1, 38.8, 42.6 (CH₂); 165.6 (C); C₉H₁₈ClNO (191.70), ber. C 56.39, H 9.46, N 7.31, gef. C 56.77, H 9.51, N 7.13; MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 224.2 (84) [M+33]⁺, 192.2 (100) [M+H]⁺, 94.1 (23) [M-98]⁺.

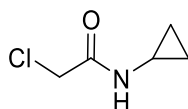
2-Chlor-*N*-isopropylacetamid (**55b**)



Nach AAV5 aus Propan-2-amin (328 µL, 4.00 mmol), 2-Chloracetylchlorid (**57**, 478 µL, 6.00 mmol) und K₂CO₃ (994 mg, 7.19 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL). Nach Extraktion wurde farbloses Pulver (297 mg, 85%) erhalten.

Schmp.: 59 – 60 °C (Lit.: 60 – 62 °C³⁴⁰, 60 °C³⁴¹); IR (KBr): 3285 cm⁻¹ (NH), 2976 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, 2 CH₃), 3.78 – 3.88 (m, 1H, CH), 3.99 (s, 2H, CH₂), 8.06 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, Amid); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 22.0 (2C) (CH₃), 42.7 (CH₂), 40.9 (CH), 164.7 (C); C₅H₁₀ClNO (135.59), ber. C 44.29, H 7.43, N 10.33, gef. C 44.41, H 7.53, N 10.12; MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 136.0 (13) [M+H]⁺, 126.1 (19) [M-10]⁺, 94.1 (100) [M-43]⁺.

2-Chlor-*N*-cyclopropylacetamid (**55c**)

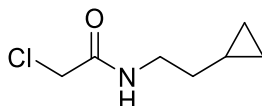


Nach AAV5 aus Cyclopropanamin (278 µL, 4.00 mmol), 2-Chloracetylchlorid (**57**, 478 µL, 6.00 mmol) und K₂CO₃ (994 mg, 7.19 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL). Nach Extraktion wurde farbloses Pulver (538 mg, 100%) erhalten.

Schmp.: 86 – 87 °C (Lit.: 81 – 84 °C³⁴²); IR (KBr): 3271 cm⁻¹ (NH), 1692 cm⁻¹, 1649 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 0.39 – 0.46 (m, 2H, CH₂), 0.56 – 0.69 (m, 2H, CH₂), 2.60 – 2.68 (m, 1H, CH), 3.97 (s, 2H, CH₂), 8.28 (br s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 5.6 (2C), 42.5

(CH₂), 22.6 (CH), 166.9 (C); C₅H₈ClNO (133.58), ber. C 44.96, H 6.04, N 10.49, gef. C 45.20, H 6.07, N 10.22.

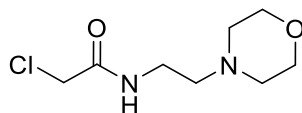
2-Chlor-N-(2-cyclopropylethyl)acetamid (**55d**)



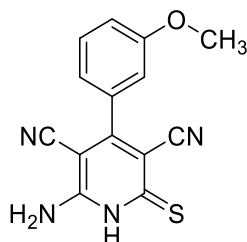
Nach AAV5 aus 2-Cyclopropylethan-1-amin-Hydrochlorid (243 mg, 2.00 mmol), 2-Chloracetylchlorid (**57**, 239 μ L, 3.00 mmol) und K₂CO₃ (497 mg, 3.60 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL). Nach Extraktion wurde farbloses Öl (323 mg, 100%) erhalten.

IR (KBr): 3297 cm⁻¹ (NH), 2932 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1660 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 0.01 – 0.05 (m, 2H, CH₂), 0.36 – 0.42 (m, 2H, CH₂), 0.63 – 0.72 (m, 1H, CH), 1.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.12 – 3.17 (m, 2H, CH₂), 4.03 (s, 2H, CH₂), 8.20 (s, 1H, Amid); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 4.0 (2C), 33.7, 38.9, 42.6 (CH₂), 8.4 (CH), 165.5 (C); C₇H₁₂ClNO (161.63); MS (APCI pos.): *m/z* (%) = 230.0 (100) [M+68]⁺, 174.0 (54) [M+12]⁺, 162.0 (35) [M+H]⁺.

2-Chlor-N-(2-morpholinoethyl)acetamid (**55e**)

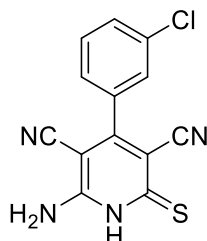


Nach AAV5 aus 4-(2-Aminoethyl)morpholin (522 μ L, 4.00 mmol), 2-Chloracetylchlorid (**57**, 478 μ L, 6.00 mmol) und K₂CO₃ (994 mg, 7.19 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (8 mL). Nach Extraktion wurde farbloses Pulver (967 mg, 117%) erhalten, das säulenchromatographisch aufgereinigt wurde (Ethylacetat/Ethanol 1:1). Sowohl die NMR-Analyse als auch die Ausbeute von >100% lassen jedoch auf Verunreinigungen schließen. Das Produkt wurde unaufgereinigt weiterverwendet.

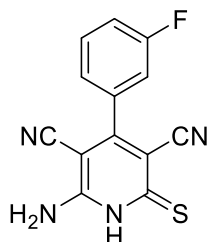
6-Amino-4-(3-methoxyphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58a**)

Nach AAV2 wurden 3-Methoxybenzaldehyd (304 μL , 2.50 mmol), 2-Cyanthioacetamid (**59**, 250 mg, 2.50 mmol) und Malonsäuredinitril (**60**, 165 mg, 2.50 mmol) mit Piperidin (50 μL) in Ethanol (4 mL) für 3 h 20 min zum Reflux erhitzt. Nach entsprechender Aufarbeitung wurde der braun-orange Feststoff auf Kieselgel (3 g) aufgezogen und säulenchromatographisch aufgereinigt (Toluol/Ethylacetat/TEA 1:5:0.025). Es wurde gelbes Pulver (208 mg, 30%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Aufreinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

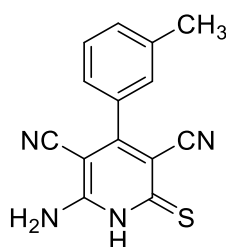
Schmp.: 240 °C; IR (KBr): 3426 cm^{-1} , 3389 cm^{-1} , 3315 cm^{-1} (NH), 2187 cm^{-1} , 2176 cm^{-1} (C \equiv N); $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{OS}$ (282.32); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 315.0 (30) $[\text{M}+33]^+$, 282.9 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 218.9 (7) $[\text{M}-63]^+$, MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 280.8 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6-Amino-4-(3-chlorophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58b**)

Nach AAV2 wurden 3-Chlorbenzaldehyd (1414 mg, 10.06 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 663 mg, 10.0 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 1.00 g, 9.98 mmol) in Ethanol (30 mL) und Piperidin (500 μL , 5.00 mmol) für 3 h zum Reflux erhitzt. Es wurde eine gelb-braune, zähe Masse (758 mg, 26%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Aufreinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

6-Amino-4-(3-fluorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58c**)

Nach AAV2 wurden 3-Fluorbenzaldehyd (298 mg, 2.41 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 136 mg, 2.05 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 200 mg, 2.00 mmol) in Ethanol (8 mL) und Piperidin (100 μ L, 1.01 mmol) für 3 h 30 min zum Reflux erhitzt. Es wurde eine gelb-braune, zähe Masse (463 mg, 86%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Aufreinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

6-Amino-4-(3-methylphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58d**)

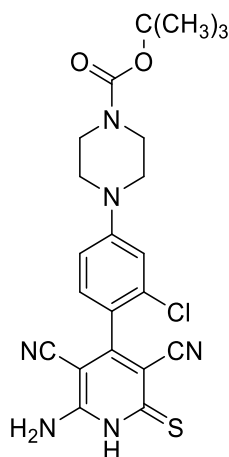
Methode A: Nach AAV2 wurden 3-Methylbenzaldehyd (627 mg, 5.21 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 355 mg, 5.37 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 502 mg, 5.01 mmol) in Ethanol (20 mL) und Piperidin (250 μ L, 2.53 mmol) für 4 h zum Reflux erhitzt. Es wurde eine gelb-braune, zähe Masse (982 mg, 74%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Reinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

Methode B: 3-Methylbenzaldehyd (236 μ L, 2.00 mmol), 2-Cyanthioacetamid (208 mg, 2.08 mmol), Triethylamin (50 μ L) und 5 Kügelchen Molekularsieb wurden in getrocknetem Toluol (10 mL) für 1 h auf 50 °C erhitzt. Anschließend wurde für 3 h 30 min auf 100 °C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt (14 h). Danach wurde der Ansatz für einen Tag bei 4 °C gelagert. Schließlich wurde der Niederschlag abfiltriert. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Ethylacetat) ergab gelb-braunes Pulver (109 mg, 41%).

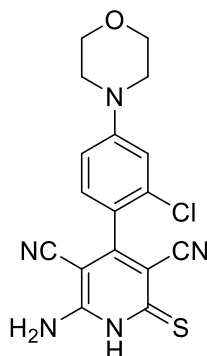
Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Aufreinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet.

Analytikdaten des Produkts aus Methode B: Schmp.: 207 – 214 °C (Zers.); IR (KBr): 3379 cm^{-1} (NH), 2922 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2214 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 2.38 (s, 3H, CH_3), 7.25 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.34 – 7.40 (m, 1H, ArH), 7.40 – 7.47 (m, 1H, ArH), 7.95 (br s, 2H, NH_2 , Signallöschung nach H/D-Tausch), 13.02 (br s, 1H, NH, Signallöschung nach H/D-Tausch); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 20.8 (CH_3), 124.9, 128.1, 128.4, 130.9 (CH); 81.4, 102.3, 114.5, 116.4, 134.2, 137.8, 154.4, 158.8, 179.3 (C); $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}$ (266.32); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 299.3 (34) $[\text{M}+33]^+$, 282.2 (36) $[\text{M}+16]^+$, 267.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 181.0 (10) $[\text{M}-85]^+$, 167.1 (14) $[\text{M}-99]^+$, 150.1 (13) $[\text{M}-150]^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 265.2 (100) $[\text{M}-\text{H}]^-$.

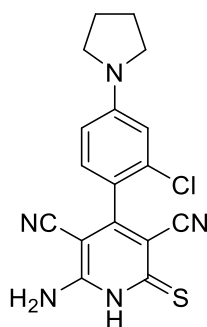
tert-Butyl-4-[4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (58e)



Nach AAV2 wurden *tert*-Butyl-4-(3-chlor-4-formylphenyl)piperazin-1-carboxylat (**52a**, 432 mg, 1.33 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 137 mg, 2.10 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 210 mg, 2.10 mmol) in Ethanol (8 mL) und Piperidin (100 μL , 1.01 mmol) für 4 h 30 min zum Rückfluss erhitzt. Nach Extraktion wurde ein braunes, zähes Öl (951 mg, 152%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Aufreinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

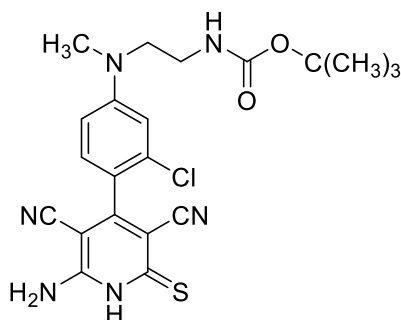
6-Amino-4-(2-chlor-4-morpholinophenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58f**)

Nach AAV2 wurden 2-Chlor-4-morpholinobenzaldehyd (**52d**, 785 mg, 3.48 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 242 mg, 3.67 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 353 mg, 3.53 mmol) in Ethanol (14 mL) und Piperidin (175 μ L, 1.77 mmol) für 5 h 30 min zum Reflux erhitzt. Es wurde eine braune, zähe Masse (1.18 g, 91%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Reinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

6-Amino-4-[2-chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58g**)

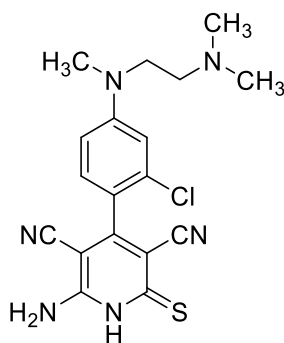
Nach AAV2 wurde 2-Chlor-4-(pyrrolidin-1-yl)benzaldehyd (**52b**, 419 mg, 2.00 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 137 mg, 2.08 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 200 mg, 2.00 mmol) in Ethanol (10 mL) und Piperidin (100 μ L, 1.01 mmol) für 5 h 15 min zum Reflux erhitzt. Nach Extraktion wurde eine rot-bräunliche Masse (829 mg, 116%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Reinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

tert-Butyl-(2-([4-(6-amino-3,5-dicyan-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)-3-chlorophenyl]-(methyl)-amino)ethyl)carbamate (**58h**)



Nach AAV2 wurden *tert*-Butyl-2-[(3-chlor-4-formylphenyl)(methyl)amino]ethylcarbamate (**52e**, 363 mg, 1.16 mol), Malonsäuredinitril (**60**, 77 mg, 1.2 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 116 mg, 1.16 mmol) in Ethanol (5 mL) und Piperidin (100 μ L, 1.01 mmol) für 6 h zum Reflux erhitzt. Es wurde oranger Feststoff (490 mg, 92%) erhalten. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Reinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

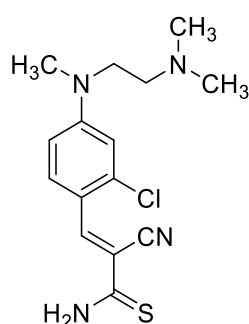
6-Amino-4-(2-chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}phenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58i**)



Nach AAV2 wurden 2-Chlor-4-{[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino}benzaldehyd (**52c**, 1.75 g, 7.29 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 481 mg, 7.28 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 730 mg, 7.29 mmol) in Ethanol (5 mL) und Piperidin (250 μ L, 2.53 mmol) für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Dichlormethan/Methanol/TEA 1:1:0.05) wurde orangefarbenes Pulver (996 mg, 35%) erhalten. Das Produkt enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Aufgrund der oxidativen Dimerisierung der 1,2-Dihydropyridin-3,5-dicarbonitrile wurde diese Zwischenstufe ohne weitere Reinigung für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids genutzt.

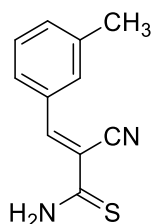
Schmp.: 231 – 235 °C (Zers.); IR (KBr): 3422 cm⁻¹ (br, NH), 2204 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.67 (s, 6H, 2 CH₃), 2.94 – 3.08 (m, 5H, CH₃ und CH₂), 3.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 6.80 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, ArH), 6.84 – 6.98 (m, 3H, ArH und NH₂), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 10.30 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 37.9 (2C), 43.3 (CH₃), 47.3, 53.5 (CH₂), 110.4, 111.6, 130.4 (CH), 80.7, 103.0, 116.9, 118.5, 121.9, 132.1, 149.8, 154.1, 156.9 (C, ein weiteres quartäres Kohlenstoffatomsignal auch nach 2048 Scans nicht detektiert); C₁₈H₁₉ClN₆S (386.90); MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 401.3 (100) [M+14]⁺, 387.4 (32) [M+H]⁺.

3-(2-Chlor-4-{{2-(dimethylamino)ethyl}(methyl)amino}phenyl)-2-cyanprop-2-enthioamid (**61a**)

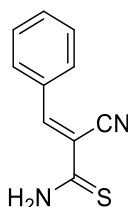


Isoliertes Nebenprodukt bei der Synthese von 6-Amino-4-(2-chlor-4-{{2-(dimethylamino)ethyl}(methyl)amino}phenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58i**) aus 2-Chlor-4-{{2-(dimethylamino)ethyl}(methyl)amino}benzaldehyd (**48b**, 447 mg, 1.98 mmol), 2-Cyanthioacetamid (198 mg, 1.98 mmol) und Malonsäuredinitril (262 mg, 3.96 mmol) in Ethanol (4 mL) und Piperidin (50 µL) für 3 h 45 min bei 100 °C. Nach Umkristallisation aus Ethylacetat wurde rotes Pulver (256 mg, 40%) erhalten.

Schmp.: 202 – 205 °C (Zers.); IR (KBr): 3348 cm⁻¹ (NH), 2199 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2.19 (s, 6H, 2 CH₃), 2.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 3.06 (s, 3H, CH₃), 3.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 6.85 – 6.90 (m, 2H, ArH), 8.20 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, ArH), 8.48 (s, 1H, CH), 9.29 (br s, 1H, NH₂), 9.91 (br s, 1H, NH₂); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) = 38.4, 45.4 (2C) (CH₃), 49.4, 55.8 (CH₂), 110.7, 111.7, 130.1, 145.4 (CH), 105.6, 115.2, 117.2, 138.6, 152.5, 192.4 (C); C₁₅H₁₉ClN₄S (322.86); ber. C 55.80, H 5.93, N 17.35, gef. C 55.78, H 5.77, N 16.97; MS (APCI-DI pos.): *m/z* (%) = 323.3 (100) [M+H]⁺, 289.3 (80) [M-36]⁺, 244.2 (16) [M-79]⁺; MS (APCI-DI neg.): *m/z* (%) = 321.3 (100) [M-H]⁻, 285.3 (43) [M-38]⁻, 269.2 (54) [M-54]⁻.

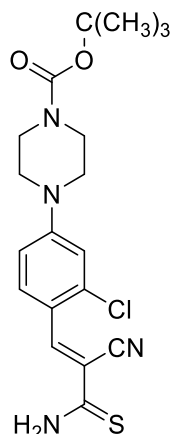
2-Cyan-3-(3-methylphenyl)prop-2-enthioamid (**61b**)

Nach AAV3 aus 3-Methylbenzaldehyd (249 μL , 2.11 mmol), 2-Cyanthioacetamid (**59**, 212 mg, 2.11 mmol) und Triethylamin (50 μL) in Ethanol (2 mL) für 1 h. Es wurde eine braune Masse (346 mg, 81%) erhalten, die unaufgereinigt weiterverwendet wurde.

2-Cyan-3-phenylprop-2-enthioamid (**61c**)

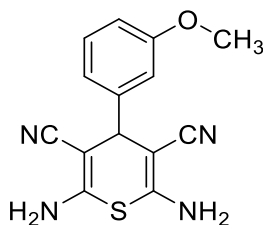
Nach AAV3 aus Benzaldehyd (503 μL , 4.43 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 446mg, 4.46 mmol) in Ethanol (5 mL) und Triethylamin (50 μL) für 2 h 30 min bei 55 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1) wurde oranges Pulver (275 mg, 33%) erhalten.

Schmp.: 130 – 133 °C (Lit.: 145 °C³⁴³, 149–150 °C³⁴⁴); IR (KBr): 3411 cm^{-1} , 3362 cm^{-1} , 3303 cm^{-1} (NH), 2224 cm^{-1} , 2187 cm^{-1} (C \equiv N); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.53 – 7.65 (m, 3H, ArH), 7.90 – 7.97 (m, 2H, ArH), 8.08 (s, 1H, CH), 9.66 (br s, 1H, NH), 10.14 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) = 129.1 (2C), 130.0 (2C), 132.1, 146.6 (CH), 112.4, 116.2, 131.8, 192.2 (C); C₁₀H₈N₂S (188.25); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 308.8 (30) [M+121]⁺, 278.9 (44) [M+91]⁺, 188.8 (100) [M+H]⁺, 171.9 (56) [M-17]⁺, 154.9 (15) [M-34]⁺.

tert-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxoprop-1-en-1-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (61d)

Nach AAV3 aus *tert*-Butyl-4-(3-chlor-4-formylphenyl)piperazin-1-carboxylat (**52a**, 565 mg, 1.74 mmol) und 2-Cyanthiothioacetamid (**59**, 174 mg, 1.74 mmol) in Ethanol (2 mL) und Triethylamin (50 μ L) für 10 min bei 55 °C. Es wurde rot-oranges Pulver (700 mg, 99%) erhalten.

Schmp.: 168 – 172 (Zers.); IR (KBr): 3393 cm^{-1} , 3291 cm^{-1} , (NH), 2977 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2196 cm^{-1} (C \equiv N), 1686 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.42 (s, 9H, CH₃), 3.42 – 3.50 (m, 8H, 4 CH₂), 7.06 (dd, J = 9.2 Hz, 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.14 (d, J = 2.7 Hz, 1H, ArH), 8.16 (d, J = 9.1 Hz, 1H, ArH), 8.40 (s, 1H, CH), 9.40 (br s, 1H, NH₂), 9.98 (br s, 1H, NH₂); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 27.9 (3C) (CH₃); 45.8 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 512 Scans nicht detektierbar); 112.4, 113.7, 130.2, 144.7 (CH), 79.1, 107.9, 116.8, 117.3, 138.2, 153.2, 153.7, 192.2 (C); C₁₉H₂₃ClN₄O₂S (406.93); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 406.8 (82) [M+H]⁺, 370.9 (15) [M-36]⁺, 350.8 (20) [M-56]⁺, 334.8 (17) [M-72]⁺, 316.8 (84) [M-90]⁺, 272.8 (100) [M-134]⁺.

2,6-Diamino-4-(3-methoxyphenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitril (81a)

Detektiertes Nebenprodukt bei der Synthese von **58a**. Dabei wurde 3-Methoxybenzaldehyd (304 μ L, 2.50 mmol), Malonsäuredinitril (**60**, 165 mg, 2.50 mmol) und 2-Cyanthioacetamid (**59**, 250 mg, 2.50 mmol) in Ethanol (4 mL) gelöst und mit Piperidin (50 μ L) versetzt. Der Ansatz wurde für 3 h 20 min zum Reflux erhitzt.

Nach Beenden der Reaktion wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei fielen Kristalle aus, die abfiltriert wurden. Die Kristalle eigneten sich für eine Röntgenkristallstrukturanalyse. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedunstet. Der ölige Rückstand wurde nacheinander mit Wasser (10 mL), Essigsäure (15 Tropfen) und Dichlormethan (2 mL) versetzt und stark geschüttelt. Nach Lagerung im Kühlschrank (15 min, 4 °C) wurde gelber Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde auf Kieselgel (3 g) gezogen und säulenchromatographisch (Toluol/Ethylacetat/TEA 1:5:0.025) aufgereinigt. Es wurde gelb-oranges Pulver (209 mg, 29%) erhalten.

Schmp.: 161 – 162 °C; IR (KBr): 3426 cm^{-1} , 3389 cm^{-1} , 3316 cm^{-1} (NH), 2187 cm^{-1} , 2169 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$); ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) = 3.74 (s, 3H, CH_3), 4.23 (s, 1H, CH), 6.75 – 6.77 (m, 1H, ArH), 6.80 – 6.83 (m, 1H, ArH), 6.84 (ddd, J = 8.3, 2.6, 0.9 Hz, 1H, ArH), 6.92 (br s, 4H, NH_2), 7.27 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ArH); ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) = 43.1 (CH_3), 54.9, 111.8, 112.7, 118.8, 129.7 (CH), 71.8 (2C), 118.7 (2C), 144.9, 151.2 (2C), 159.3 (C); $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OS}$ (284.34); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 285.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 219.2 (17) $[\text{M}-65]^+$, 202.2 (14) $[\text{M}-82]^+$, 185.1 (52) $[\text{M}-99]^+$, 177.1 (37) $[\text{M}-107]^+$, MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 281.1 (73) $[\text{M}-3]^-$, 247.2 (26) $[\text{M}-37]^-$, 217.1 (58) $[\text{M}-67]^-$, 169.0 (100) $[\text{M}-115]^-$; HPLC (grad.): 99.5% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 8.5 min; λ_{max} : 220 nm, 246 nm.

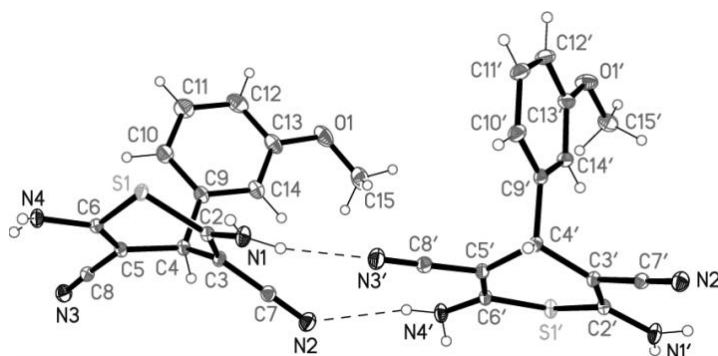
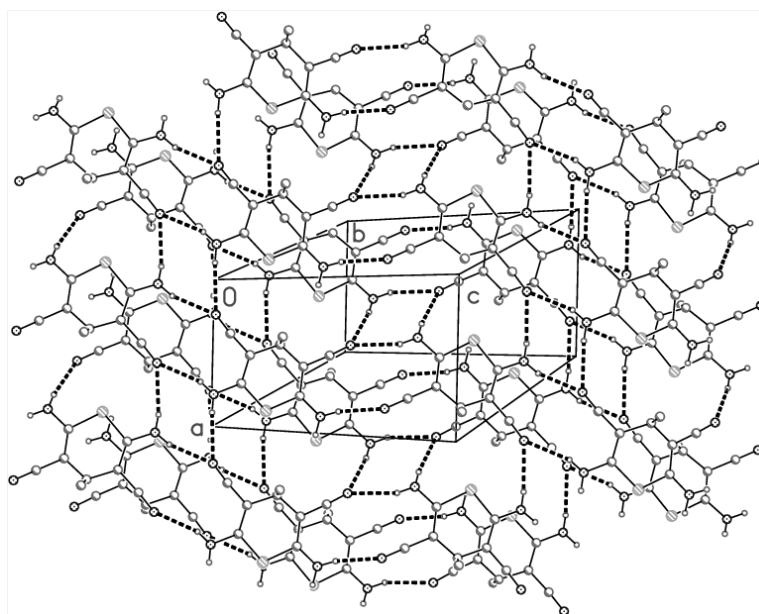


Abbildung 10-2: Röntgenkristallstruktur von zwei unabhängigen Molekülen der Struktur **81a**. Die Nummerierung entspricht nicht der Anordnung von Lokanten gemäß IUPAC-Nomenklatur.

Abbildung 10-3: Röntgenkristallgitterstruktur der wellenförmig angeordneten Verbindung **81a**.Tabelle 10-12: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von **81a**.

Summenformel	$C_{14}H_{12}N_4OS$	
M_r	284.34	
Temperatur	101 (2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	Triclinic	
Raumgruppe	P(-1)	
Gitterkonstanten	$a = 6.8607(2)$ Å	$\alpha = 107.005(3)^\circ$
	$b = 13.1429(4)$ Å	$\beta = 90.788(2)^\circ$
	$c = 15.7731(4)$ Å	$\gamma = 104.992(3)^\circ$
Volumen	$1307.61(7)$ Å ³	
Z	4	
Dichte (berechnet)	1.444 Mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	0.248 mm ⁻¹	
F(000)	592	
Kristallgröße	$0.2 \times 0.2 \times 0.15$ mm ³	
Θ -Bereich für die Datensammlung	2.714 to 34.088°	
Limitierende Indices	$-10 \leq h \leq 10$, $-19 \leq k \leq 20$, $-23 \leq l \leq 24$	
Zahl der Reflexe	83451	
Unabhängige Reflexe	9753 [$R(\text{int}) = 0.0304$]	

Tabelle 10-13: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von **81a** (Fortsetzung).

Vollständigkeit bis $\Theta = 32.500^\circ$	98.7%
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und min. Transmission	1.00000 and 0.90461
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Daten/ Einschränkungen/ Parameter	9753 / 0 / 395
Goodness-of-the-fit on F^2	1.059
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0316$, $wR_2 = 0.0856$
R indices (alle Daten)	$R_1 = 0.0363$, $wR_2 = 0.0879$
Größte Differenzpeaks	0.545 and -0.367 e. \AA^{-3}

Tabelle 10-14: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a**. $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U^{ij} -Tensors.^{a,b}

	x	y	z	$U(\text{eq})$
S(1)	8778(1)	72(1)	2407(1)	13(1)
N(1)	10165(1)	2032(1)	3568(1)	15(1)
N(2)	6073(1)	3388(1)	4014(1)	19(1)
N(3)	2113(1)	-555(1)	494(1)	18(1)
N(4)	7201(1)	-1012(1)	780(1)	15(1)
O(1)	2208(1)	195(1)	5465(1)	26(1)
C(2)	8441(1)	1328(1)	3089(1)	12(1)
C(3)	6575(1)	1516(1)	3101(1)	12(1)
C(4)	4666(1)	622(1)	2626(1)	12(1)
C(5)	5068(1)	-11(1)	1707(1)	12(1)
C(6)	6805(1)	-320(1)	1547(1)	12(1)
C(7)	6352(1)	2556(1)	3607(1)	14(1)
C(8)	3483(1)	-325(1)	1015(1)	13(1)
C(9)	3780(1)	-119(1)	3194(1)	15(1)
C(10)	3378(1)	-1262(1)	2882(1)	19(1)
C(11)	2626(2)	-1889(1)	3447(1)	24(1)
C(12)	2293(2)	-1383(1)	4310(1)	24(1)
C(13)	2639(1)	-234(1)	4615(1)	20(1)
C(14)	3381(1)	397(1)	4060(1)	17(1)

Tabelle 10-15: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** (Fortsetzung). $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U^{ij} -Tensors.^{a,b}

	x	y	z	$U(\text{eq})$
C(15)	2411(2)	1355(1)	5765(1)	28(1)
S(1')	7076(1)	6205(1)	7642(1)	13(1)
N(1')	9329(1)	7942(1)	8841(1)	16(1)
N(2')	14576(1)	7814(1)	8961(1)	16(1)
N(3')	10511(1)	3841(1)	5259(1)	19(1)
N(4')	6262(1)	4873(1)	6027(1)	16(1)
O(1')	7754(1)	3403(1)	9517(1)	22(1)
C(2')	9435(1)	6978(1)	8250(1)	11(1)
C(3')	11119(1)	6603(1)	8123(1)	11(1)
C(4')	11157(1)	5480(1)	7511(1)	11(1)
C(5')	9619(1)	5097(1)	6701(1)	11(1)
C(6')	7794(1)	5324(1)	6699(1)	12(1)
C(7')	12996(1)	7288(1)	8602(1)	12(1)
C(8')	10103(1)	4405(1)	5902(1)	13(1)
C(9')	10933(1)	4597(1)	7981(1)	12(1)
C(10')	12183(1)	3892(1)	7799(1)	16(1)
C(11')	11943(1)	3061(1)	8207(1)	18(1)
C(12')	10469(1)	2928(1)	8784(1)	19(1)
C(13')	9189(1)	3624(1)	8957(1)	16(1)
C(14')	9428(1)	4465(1)	8565(1)	14(1)
C(15')	6434(1)	4104(1)	9734(1)	21(1)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern gegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-16: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a**.^{a,b}

S(1)-C(2)	1.7607(8)	S(1')-C(6')	1.7616(8)
S(1)-C(6)	1.7661(8)	S(1')-C(2')	1.7627(8)
N(1)-C(2)	1.3517(10)	N(1')-C(2')	1.3551(10)
N(2)-C(7)	1.1591(11)	N(2')-C(7')	1.1573(11)
N(3)-C(8)	1.1555(11)	N(3')-C(8')	1.1542(11)
N(4)-C(6)	1.3631(10)	N(4')-C(6')	1.3640(10)

Tabelle 10-17: Bindungslängen [Å] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** (Fortsetzung).^{a,b}

O(1)-C(13)	1.3627(11)	O(1')-C(13')	1.3645(11)
O(1)-C(15)	1.4265(14)	O(1')-C(15')	1.4282(12)
C(2)-C(3)	1.3641(11)	C(2')-C(3')	1.3641(11)
C(3)-C(7)	1.4161(11)	C(3')-C(7')	1.4197(11)
C(3)-C(4)	1.5225(11)	C(3')-C(4')	1.5169(11)
C(4)-C(5)	1.5138(11)	C(4')-C(5')	1.5198(11)
C(4)-C(9)	1.5299(11)	C(4')-C(9')	1.5268(11)
C(5)-C(6)	1.3592(11)	C(5')-C(6')	1.3598(11)
C(5)-C(8)	1.4206(11)	C(5')-C(8')	1.4230(11)
C(9)-C(10)	1.3881(12)	C(9')-C(10')	1.3928(11)
C(9)-C(14)	1.4020(12)	C(9')-C(14')	1.4042(11)
C(10)-C(11)	1.4011(13)	C(10')-C(11')	1.3991(12)
C(11)-C(12)	1.3802(15)	C(11')-C(12')	1.3817(14)
C(12)-C(13)	1.3984(15)	C(12')-C(13')	1.3996(12)
C(13)-C(14)	1.3903(12)	C(13')-C(14')	1.3934(11)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-18: Bindungswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a**.^{a,b}

C(2)-S(1)-C(6)	101.44(4)	C(7)-C(3)-C(4)	117.66(7)
C(13)-O(1)-C(15)	116.67(8)	C(5)-C(4)-C(3)	110.32(6)
N(1)-C(2)-C(3)	126.13(7)	C(5)-C(4)-C(9)	113.60(7)
N(1)-C(2)-S(1)	113.41(6)	C(3)-C(4)-C(9)	111.61(6)
C(3)-C(2)-S(1)	120.45(6)	C(6)-C(5)-C(8)	120.67(7)
C(2)-C(3)-C(7)	119.80(7)	C(6)-C(5)-C(4)	122.64(7)
C(2)-C(3)-C(4)	122.46(7)	C(8)-C(5)-C(4)	116.61(7)
C(5)-C(6)-N(4)	127.13(7)	C(7')-C(3')-C(4')	115.91(7)
C(5)-C(6)-S(1)	120.68(6)	C(3')-C(4')-C(5')	111.38(6)
N(4)-C(6)-S(1)	111.95(6)	C(3')-C(4')-C(9')	113.74(6)
N(2)-C(7)-C(3)	176.84(9)	C(5')-C(4')-C(9')	111.58(6)
N(3)-C(8)-C(5)	175.45(9)	C(6')-C(5')-C(8')	118.26(7)
C(10)-C(9)-C(14)	120.00(8)	C(6')-C(5')-C(4')	124.92(7)

Tabelle 10-19: Bindungswinkel [°] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** (Fortsetzung).^{a,b}

C(10)-C(9)-C(4)	122.37(8)	C(8')-C(5')-C(4')	116.74(7)
C(14)-C(9)-C(4)	117.63(8)	C(5')-C(6')-N(4')	126.58(7)
C(9)-C(10)-C(11)	119.43(9)	C(5')-C(6')-S(1')	121.93(6)
C(12)-C(11)-C(10)	120.82(9)	N(4')-C(6')-S(1')	111.37(6)
C(11)-C(12)-C(13)	119.69(9)	N(2')-C(7')-C(3')	176.56(9)
O(1)-C(13)-C(14)	124.06(9)	N(3')-C(8')-C(5')	179.31(9)
O(1)-C(13)-C(12)	115.94(9)	C(10')-C(9')-C(14')	120.01(8)
C(14)-C(13)-C(12)	120.00(9)	C(10')-C(9')-C(4')	119.43(7)
C(13)-C(14)-C(9)	119.99(9)	C(14')-C(9')-C(4')	120.51(7)
C(6')-S(1')-C(2')	102.24(4)	C(9')-C(10')-C(11')	119.64(8)
C(13')-O(1')-C(15')	117.48(7)	C(12')-C(11')-C(10')	120.67(8)
N(1')-C(2')-C(3')	126.09(7)	C(11')-C(12')-C(13')	119.78(8)
N(1')-C(2')-S(1')	112.13(6)	O(1')-C(13')-C(14')	124.76(8)
C(3')-C(2')-S(1')	121.77(6)	O(1')-C(13')-C(12')	115.03(8)
C(2')-C(3')-C(7')	119.10(7)	C(14')-C(13')-C(12')	120.22(8)
C(2')-C(3')-C(4')	124.98(7)	C(13')-C(14')-C(9')	119.66(8)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-20: Torsionswinkel der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** [°].^{a,b}

C(6)-S(1)-C(2)-N(1)	-153.29(6)	C(6')-S(1')-C(2')-N(1')	159.30(6)
C(6)-S(1)-C(2)-C(3)	26.95(7)	C(6')-S(1')-C(2')-C(3')	-21.48(8)
N(1)-C(2)-C(3)-C(7)	4.34(13)	N(1')-C(2')-C(3')-C(7')	-3.99(12)
S(1)-C(2)-C(3)-C(7)	-175.93(6)	S(1')-C(2')-C(3')-C(7')	176.91(6)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-172.26(8)	N(1')-C(2')-C(3')-C(4')	174.81(8)
S(1)-C(2)-C(3)-C(4)	7.46(11)	S(1')-C(2')-C(3')-C(4')	-4.29(11)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-43.75(10)	C(2')-C(3')-C(4')-C(5')	32.83(11)
C(7)-C(3)-C(4)-C(5)	139.57(7)	C(7')-C(3')-C(4')-C(5')	-148.34(7)
C(2)-C(3)-C(4)-C(9)	83.55(9)	C(2')-C(3')-C(4')-C(9')	-94.30(9)
C(7)-C(3)-C(4)-C(9)	-93.13(9)	C(7')-C(3')-C(4')-C(9')	84.53(8)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	41.45(10)	C(3')-C(4')-C(5')-C(6')	-33.45(11)
C(9)-C(4)-C(5)-C(6)	-84.73(9)	C(9')-C(4')-C(5')-C(6')	94.85(9)

Tabelle 10-21: Torsionswinkel der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** [°] (Fortsetzung).^{a,b}

C(3)-C(4)-C(5)-C(8)	-141.76(7)	C(3')-C(4')-C(5')-C(8')	149.88(7)
C(9)-C(4)-C(5)-C(8)	92.05(9)	C(9')-C(4')-C(5')-C(8')	-81.82(9)
C(8)-C(5)-C(6)-N(4)	-6.18(13)	C(8')-C(5')-C(6')-N(4')	6.44(13)
C(4)-C(5)-C(6)-N(4)	170.48(8)	C(4')-C(5')-C(6')-N(4')	-170.18(8)
C(8)-C(5)-C(6)-S(1)	179.88(6)	C(8')-C(5')-C(6')-S(1')	-178.00(6)
C(4)-C(5)-C(6)-S(1)	-3.46(11)	C(4')-C(5')-C(6')-S(1')	5.37(11)
C(2)-S(1)-C(6)-C(5)	-29.12(7)	C(2')-S(1')-C(6')-C(5')	20.96(8)
C(2)-S(1)-C(6)-N(4)	156.09(6)	C(2')-S(1')-C(6')-N(4')	-162.87(6)
C(5)-C(4)-C(9)-C(10)	-0.48(11)	C(3')-C(4')-C(9')-C(10')	-135.95(8)
C(3)-C(4)-C(9)-C(10)	-125.98(9)	C(5')-C(4')-C(9')-C(10')	97.02(9)
C(5)-C(4)-C(9)-C(14)	179.24(7)	C(3')-C(4')-C(9')-C(14')	46.57(10)
C(3)-C(4)-C(9)-C(14)	53.73(10)	C(5')-C(4')-C(9')-C(14')	-80.46(9)
C(14)-C(9)-C(10)-C(11)	-1.70(13)	C(14')-C(9')-C(10')-C(11')	-0.62(12)
C(4)-C(9)-C(10)-C(11)	178.01(8)	C(4')-C(9')-C(10')-C(11')	-178.11(8)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-0.44(15)	C(9')-C(10')-C(11')-C(12')	0.47(13)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	2.41(15)	C(10')-C(11')-C(12')-C(13')	0.56(14)
C(15)-O(1)-C(13)-C(14)	4.55(13)	C(15')-O(1')-C(13')-C(14')	-1.59(13)
C(15)-O(1)-C(13)-C(12)	-175.58(9)	C(15')-O(1')-C(13')-C(12')	178.62(8)
C(11)-C(12)-C(13)-O(1)	177.87(9)	C(11')-C(12')-C(13')-O(1')	178.35(8)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-2.25(14)	C(11')-C(12')-C(13')-C(14')	-1.45(13)
O(1)-C(13)-C(14)-C(9)	180.00(8)	O(1')-C(13')-C(14')-C(9')	-178.48(8)
C(12)-C(13)-C(14)-C(9)	0.13(13)	C(12')-C(13')-C(14')-C(9')	1.31(13)
C(10)-C(9)-C(14)-C(13)	1.86(13)	C(10')-C(9')-C(14')-C(13')	-0.27(12)
C(4)-C(9)-C(14)-C(13)	-177.87(8)	C(4')-C(9')-C(14')-C(13')	177.20(7)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 10-22: Wasserstoffbrücken der Röntgenkristallstruktur der Verbindung **81a** [Å und °].^{a,b}

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(02)...N(3')	0.861(15)	2.125(15)	2.9671(11)	165.8(14)
N(4)-H(03)...N(2')1	0.874(15)	2.272(15)	3.1117(11)	160.9(13)
N(4)-H(04)...N(3)2	0.902(15)	2.432(15)	3.3277(11)	171.9(12)
N(1')-H(01')...N(2')3	0.849(16)	2.451(16)	3.2330(11)	153.4(14)
N(1')-H(02')...N(3)4	0.860(16)	2.211(15)	3.0413(11)	162.2(14)
N(4')-H(03')...N(2)	0.871(14)	2.351(14)	3.1841(11)	160.2(12)
N(4')-H(04')...N(2)5	0.843(16)	2.292(16)	3.1260(11)	170.1(14)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. ^b Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

1 x-1,y-1,z-1

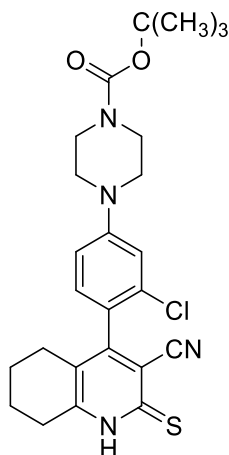
2 x+1,y,z

3 x-1,y,z

4 x+1,y+1,z+1

5 -x+1,-y+1,-z+1

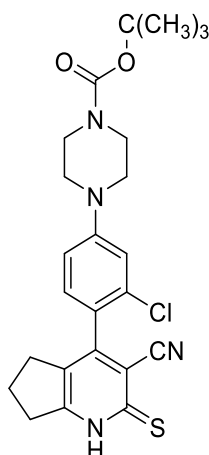
tert-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-4-yl)phenyl]piperazin-1-carboxylat (**82a**)



Nach AAV4 aus *tert*-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxoprop-1-en-1-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (**61d**, 546 mg, 1.24 mmol), Cyclohexanon (130 μ L, 1.24 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 2:1) wurde oranges Pulver (134 mg, 22%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

Schmp.: 199 – 203 °C (Zers.); IR (KBr): 3428 cm^{-1} (br, NH), 2979 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2225 cm^{-1} (C \equiv N), 1694 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, CH₃), 1.54 – 1.64 (m, 2H, CH₂), 1.64 – 1.73 (m, 2H, CH₂), 1.97 – 2.13 (m, 2H, CH₂), 2.71 – 2.85 (m, 2H, CH₂), 3.23 – 3.33 (m, 4H, 2 CH₂), 3.40 – 3.53 (m, 4H, 2 CH₂), 7.04 (dd, J = 8.7 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, J = 2.3 Hz, 1H, ArH), 7.17 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 14.03 (br s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.0 (3C) (CH₃); 20.3, 21.0, 24.6, 27.0, 46.7 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 480 Scans nicht detektierbar); 113.8, 114.8, 129.6 (CH); 79.0, 115.9, 121.2, 122.8, 131.1, 151.9, 152.5, 153.8, 155.5, 175.2 (C, ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom-Signal auch nach 480 Scans nicht detektierbar); C₂₅H₂₉ClN₄O₂S (485.04); ber. C 61.91, H 6.03, N 11.55, gef. C 62.13, H 5.94, N 11.25; MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 540.8 (8) [M+56]⁺, 484.8 (22) [M+H]⁺, 440.8 (62) [M-44]⁺, 428.8 (100) [M-56]⁺, 396.8 (12) [M-88]⁺, 384.8 (44) [M-100]⁺.

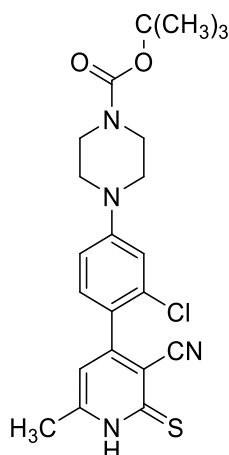
tert-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1*H*-cyclopenta[*b*]pyridin-4-yl)phenyl]-piperazin-1-carboxylat (**82b**)



Nach AAV4 aus *tert*-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxoprop-1-en-1-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (**61d**, 406 mg, 1.00 mmol) und Cyclopentanon (89 μ L, 1.0 mmol) in 1,4-Dioxan (1 mL) und Piperidin (50 μ L) für 1 h 45 min bei 80 °C. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1:1 \rightarrow Ethylacetat 1) wurde gelbes Pulver (259 mg, 55%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Aufreinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

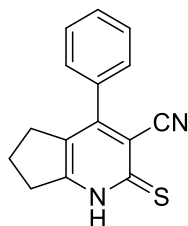
Schmp.: 202 – 212 °C; IR (KBr): 3432 cm^{-1} (br, NH), 2974 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2223 cm^{-1} (C \equiv N), 1692 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.41 – 1.45 (m, 9H, 3 CH₃), 1.98 – 2.09 (m, 2H, CH₂), 2.40 – 2.50 (m, 2H, CH₂), 2.92 – 3.07 (m, 2H, CH₂), 3.25 – 3.31 (m, 4H, 2 CH₂), 3.46 (t, J = 5.1 Hz, 4H, 2 CH₂), 7.03 (dd, J = 9.1 Hz, 2.7 Hz, 1H, ArH), 7.13 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.24 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 14.45 (br s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 28.0 (CH₃), 21.8, 28.7, 31.4, 46.6 (CH₂, ein weiteres tertiäres Kohlenstoffsignal auch nach 480 Scans nicht detektierbar), 113.5, 114.7, 129.9 (CH), 79.0, 113.7, 116.5, 122.7, 127.7, 131.3, 152.0, 152.2, 153.8, 158.9, 176.4 (C); C₂₄H₂₇ClN₄O₂S (471.02); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 470.8 (4) [M+H]⁺, 447.0 (100) [M-24]⁺, 426.8 (72) [M-44]⁺, 414.7 (26) [M-56]⁺, 382.9 (18) [M-88]⁺, 370.9 (100) [M-100]⁺, 338.9 (23) [M-132]⁺.

tert-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-6-methyl-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-4-yl)phenyl]piperazin-1-carboxylat (**82c**)



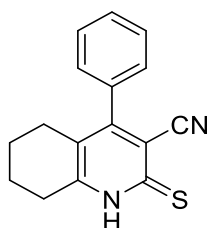
Nach AAV4 aus *tert*-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxoprop-1-en-1-yl)-3-chlorophenyl]piperazin-1-carboxylat (**61d**, 782 mg, 1.92 mmol), Aceton (142 μ L, 1.92 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h 30 min. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1:1→1:3) wurde helloranges Pulver (292 mg, 33%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

Schmp.: 202 – 212 °C; IR (KBr): 3432 cm^{-1} (br, NH), 2968 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2226 cm^{-1} (C \equiv N), 1704 cm^{-1} , 1686 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, 3 CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 3.26 – 3.31 (m, 4H, 2 CH₂), 3.46 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 CH₂), 6.69 – 6.72 (m, 1H, ArH), 7.03 (dd, J = 8.8 Hz, 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 14.12 (br s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 18.9, 27.9 (3C) (CH₃); 46.7 (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 480 Scans nicht detektierbar), 113.3, 114.9, 115.0, 130.6 (CH), 79.0, 113.6, 116.2, 123.8, 131.6, 152.2, 153.1, 153.7, 154.9, 177.8 (C); C₂₂H₂₅ClN₄O₂S (444.98); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 446.9 (100) [M+H]⁺, 306.9 (8) [M-138]⁺, 180.8 (15) [M-264]⁺.

4-Phenyl-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b]pyridin-3-carbonitril (**82d**)

Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-phenylprop-2-enthioamid (**61c**, 267 mg, 1.42 mmol) und Cyclopentanone (126 μ L, 1.42 mmol) in 1,4-Dioxan (1 mL) und Piperidin (50 μ L) bei 80 °C für 3 h. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1 \rightarrow Ethylacetat 1 \rightarrow Ethanol 1) wurde braun-oranges Pulver (155 mg, 43%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

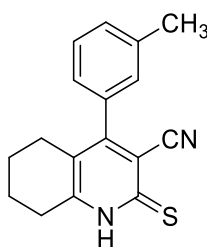
Schmp.: 200 – 204 °C (Zers.) (Lit.: 240 – 242³⁴⁵, 239 – 240 °C^{301,312,346}); IR (KBr): 3432 cm^{-1} (br NH), 2944 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} , 2809 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2219 cm^{-1} (C \equiv N); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.98 – 2.07 (m, 2H, CH₂), 2.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 2.98 (t, *J* = 7., 2H, CH₂), 7.46 – 7.60 (m, 5H, ArH), 14.43 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 22.1, 29.1, 31.5 (CH₂); 127.9 (2C), 128.6 (2C), 129.8 (CH), 112.1, 116.9, 126.6, 134.6, 154.0, 159.1, 176.8 (C); C₁₅H₁₂N₂S (252.34); MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 252.9 (100) [M+H]⁺.

4-Phenyl-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**82e**)

Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-phenylprop-2-enthioamid (**61c**, 125 mg, 0.664 mmol), Cyclohexanon (69 μ L, 0.67 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h 45 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde oranges Pulver (38 mg, 21%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

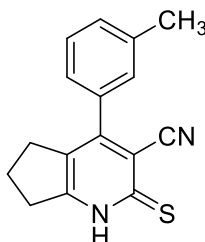
Schmp.: 207 – 215 °C (Zers) (Lit.: 240–242 °C³⁴⁷, 267–268 °C³¹², 238 °C³⁴⁸); IR (KBr): 3434 cm⁻¹ (NH), 2925 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2229 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.52 – 1.61 (m, 2H, CH₂), 1.65 – 1.73 (m, 2H, CH₂), 2.06 – 2.10 (m, 2H, CH₂), 2.78 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 7.31 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.48 – 7.57 (m, 3H, ArH), 13.98 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 20.3, 21.2, 25.2, 27.1 (CH₂), 127.3 (2C), 128.7 (2C), 129.1 (CH), 113.7, 116.2, 120.3, 135.0, 152.3, 157.7, 175.3 (C); C₁₆H₁₄N₂S (266.36); MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 266.8 (100) [M+H]⁺, 234.9 (25) [M-31]⁺.

4-(3-Methylphenyl)-2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-3-carbonitril (**82f**)



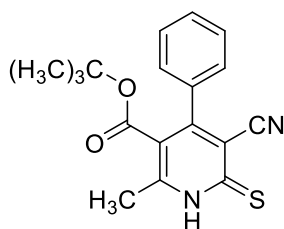
Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-(3-methylphenyl)prop-2-enthioamid (**61b**, 119 mg, 0.591 mmol), Cyclohexanon (61 µL, 0.59 mmol) und Piperidin (50 µL) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h 45 min. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1) wurde gelbes Pulver (50 mg, 30%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgeklärter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamins verwendet.

Schmp.: 172 – 175 °C; IR (KBr): 3434 cm⁻¹ (br NH), 2946 cm⁻¹, 2926 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2220 cm⁻¹ (C≡N); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.53 – 1.60 (m, 2H, CH₂), 1.66 – 1.93 (m, 2H, CH₂), 2.01 – 2.15 (m, 2H, CH₂), 2.33 – 2.42 (m, 3H, CH₃), 2.78 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 7.08 – 7.18 (m, 2H, ArH), 7.29 – 7.35 (m, 1H, ArH), 7.39 – 7.46 (m, 1H, ArH), 13.96 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 20.8 (CH₃), 20.3, 21.2, 25.2, 27.1 (CH₂), 124.4, 127.6, 128.6, 129.8 (CH), 113.7, 116.3, 120.3, 134.9, 138.0, 152.3, 157.8, 175.2 (C); C₁₇H₁₆N₂S (280.39); MS (APCI-ASAP pos.): *m/z* (%) = 446.9 (15) [M+43]⁺, 280.8 (100) [M+H]⁺, 248.9 (97) [M-31]⁺.

4-(3-Methylphenyl)-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[b]pyridin-3-carbonitril (**82g**)

Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-(3-methylphenyl)prop-2-enthioamid (**61b**, 213 mg, 1.05 mmol), Cyclopentanon (94 μ L, 1.1 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 4 h. Nach säulenchromatographischer Aufgereinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1) wurde gelbes Pulver (82 mg, 29%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

Schmp.: 206 – 211 °C; IR (KBr): 3431 cm^{-1} (NH), 2948 cm^{-1} , 2891 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2236 cm^{-1} (C \equiv N); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 2.02 (p, J = 7.5 Hz, 2H, CH $_2$), 2.36 – 2.40 (m, 3H, CH $_3$), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH $_2$), 2.97 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH $_2$), 7.23 – 7.38 (m, 3H, ArH), 7.40 – 7.48 (m, 1H, ArH), 14.39 (br s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 20.8 (CH $_3$), 22.0, 29.1, 31.4 (CH $_2$), 124.9, 128.2, 128.5, 130.4 (CH), 112.1, 116.9, 126.5, 134.6, 137.9, 154.2, 159.0, 176.8 (C); C $_{16}$ H $_{14}$ N $_2$ S (266.36); MS (APCI pos.): m/z (%) = 266.8 (100) [M+H] $^+$, 234.8 (10) [M-31] $^+$.

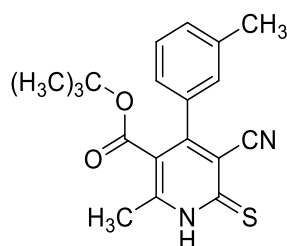
tert-Butyl-5-cyan-2-methyl-4-phenyl-6-thioxo-1,6-dihydropyridin-3-carboxylat (**82h**)

Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-phenylprop-2-enthioamid (**61c**, 207 mg, 1.10 mmol), *tert*-Butylacetoacetat (181 μ L, 1.10 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h 30 min. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 3:1) wurde gelbes Pulver (117 mg, 33%) erhalten.

Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

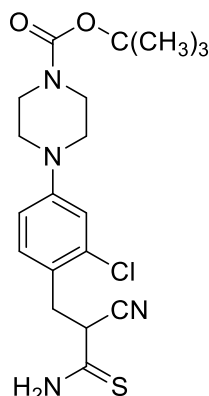
Schmp.: 231 – 239 °C (Zers.); IR (KBr): 3364 cm⁻¹ (NH), 2977 cm⁻¹, 2935 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2236 cm⁻¹ (C≡N), 1720 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.10 (s, 9H, 3 CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 7.25 – 7.42 (m, 3H, ArH), 7.50 – 7.58 (m, 2H, ArH), 14.35 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 17.8, 27.0 (3C) (CH₃), 127.6 (2C), 128.6 (2C), 129.7 (CH), 82.6, 114.2, 115.8, 119.9, 135.2, 152.4, 154.7, 164.4, 178.2 (C); C₁₈H₁₈N₂O₂S (326.41); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 326.8 (100) [M+H]⁺, 270.7 (64) [M-35]⁺.

tert-Butyl-5-cyan-2-methyl-4-(3-methylphenyl)-6-thioxo-1,6-dihydropyridin-3-carboxylat (**82i**)



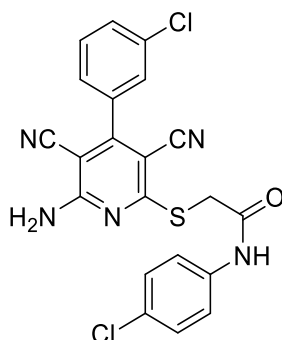
Nach AAV4 aus 2-Cyan-3-(3-methylphenyl)prop-2-enthioamid (**61b**, 289 mg, 1.43 mmol), *tert*-Butylacetoacetat (237 µL, 1.43 mmol) und Piperidin (50 µL) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 6:1→3:1) wurde gelbes Pulver (150 mg, 31%) erhalten. Dieses enthielt noch geringe Mengen des entsprechenden Disulfids. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Materials verzichtet. Das Produkt wurde in unaufgereinigter Form für die Synthese des entsprechenden 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamids verwendet.

Schmp.: 213 – 220 °C (Zers.); IR (KBr): 3431 cm⁻¹ (br, NH), 2928 cm⁻¹, 2857 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2236 cm⁻¹ (C≡N), 1718 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 1.11 (s, 9H, 3 CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 7.10 – 7.19 (m, 2H, ArH), 7.33 – 7.37 (m, 1H, ArH), 7.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 14.33 (br s, 1H, NH); ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 17.8, 20.9, 27.0 (3C) (CH₃), 124.8, 127.9, 128.5, 130.3 (CH), 82.5, 114.0, 115.8, 119.9, 135.1, 137.8, 152.3, 154.8, 163.4, 178.2 (C); C₁₉H₂₀N₂O₂S (340.44); MS (APCI-ASAP pos.): m/z (%) = 446.9 (60) [M+106]⁺, 426.7 (20) [M+86]⁺, 340.8 (68) [M+H]⁺, 308.8 (21) [M-31]⁺, 284.7 (100) [M-56]⁺, 252.8 (25) [M-88]⁺; MS (APCI-ASAP neg.): m/z (%) = 338.8 (100) [M-H]⁻.

tert-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxopropyl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (**84**)

Isoliertes Nebenprodukt bei der Synthese von *tert*-Butyl-4-[3-chlor-4-(3-cyan-2-thio-1,2,5,6,7,8-hexahydrochinolin-4-yl)phenyl]piperazin-1-carboxylat (**82a**) aus *tert*-Butyl-4-[4-(3-amino-2-cyan-3-thioxoprop-1-en-1-yl)-3-chlorphenyl]piperazin-1-carboxylat (**61d**, 546 mg, 1.24 mmol), Cyclohexanon (130 μ L, 1.24 mmol) und Piperidin (50 μ L) in 1,4-Dioxan (1 mL) bei 80 °C für 1 h. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und das Produkt wurde mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Petrolether/Ethylacetat 1:1→1:3 und Dichlormethan/Ethylacetat 10:1) wurde gelbes Pulver (45 mg, 6%) erhalten.

Schmp.: 141 – 144 °C; IR (KBr): 3373 cm^{-1} (NH), 2979 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} (CH aliphatisch), 2250 cm^{-1} (C \equiv N), 1690 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 1.42 (s, 9H, 3 CH₃), 3.14 (t, J = 5.2 Hz, 4 H, 2 CH₂), 3.20 (dd, J = 13.8 Hz, 6.7 Hz, 1H, CH), 3.29 (dd, J = 13.8 Hz, 8.9 Hz, 1H, CH), 3.43 (t, J = 5.2 Hz, 4H, 2 CH₂), 4.28 (dd, J = 8.9, 6.7 Hz, 1H, CH), 6.91 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.00 (d, J = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 9.61 (br s, 1H, NH), 9.99 (br s, 1H, NH); ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 27.9 (3C) (CH₃), 35.5, 47.4 (2C) (CH₂, zwei weitere sekundäre Kohlenstoffatom-Signale auch nach 480 Scans nicht detektierbar), 44.9 (CH), 114.2, 115.4, 131.6 (CH), 78.9, 117.9, 123.2, 133.9, 151.0, 153.7, 197.7 (C); C₁₉H₂₅ClN₄O₂S (408.95); MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 447.2 (29) [M+38]⁺, 441.0 (12) [M+32]⁺, 409.0 (13) [M+H]⁺, 353.0 (30) [M-56]⁺, 272.9 (17) [M-136]⁺, 253.0 (70) [M-156]⁺, 177.0 (100) [M-232]⁺, MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 407.1 (100) [M-H]⁻.

2-{{[6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-3,5-dicyanpyridin-2-yl]thio}-N-(4-chlorphenyl)acetamid (**89**)

Nach AAV6 aus 6-Amino-4-(3-chlorphenyl)-2-thioxo-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitril (**58b**, 230 mg, 0.803 mmol), 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)acetamid (162 mg, 0.791 mmol) und Kaliumhydroxidlösung (413 μ L, 0.800 mmol) in DMF (1 mL) für 1 h 30 min bei Raumtemperatur. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden hellgelbe Nadeln (119 mg, 33%) erhalten.

Schmp.: 258 – 260 °C; IR (KBr): 3404 cm^{-1} , 3325 cm^{-1} (NH), 2215 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1653 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 4.17 (s, 2H, CH_2), 7.37 – 7.41 (m, 2H, ArH), 7.51 – 7.54 (m, 1H, ArH), 7.59 – 7.67 (m, 4H, ArH), 7.68 – 7.72 (m, 1H, ArH), 8.09 (br s, 2H, NH_2 , bei H/D-Tausch gelöscht), 10.25 (br s, 1H, Amid); ^{13}C -NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 34.4 (CH_2), 120.8 (2C), 127.1, 128.1, 128.6 (2C), 130.2, 130.6 (CH), 86.2, 93.1, 114.8, 114.9, 127.1, 133.2, 135.7, 137.6, 156.8, 159.3, 165.7, 165.8 (C); $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{OS}$ (454.33); ber. C 55.52, H 2.88, N 15.42 gef. C 55.36, H 2.85, N 15.33; MS (APCI-DI pos.): m/z (%) = 454.1 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 437.2 (9) [$\text{M}-17$] $^+$, 327.0 (13) [$\text{M}-126$] $^+$, 301.0 (15) [$\text{M}-152$] $^+$; MS (APCI-DI neg.): m/z (%) = 452.1 (100) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$; λ_{max} : 246 nm, 293 nm, 345 nm; HPLC (grad.): 97.6% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 11.7min (System 3).

Unbekanntes Produkt aus der Stabilitätsuntersuchung

In einem Quarzrundkolben wurden 65 mg 3-Amino-N-(4-chlorphenyl)-4-(3-methylphenyl)-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-2-carbamid (**46f**) in DMSO/Wasser (5 mL, mit 5% Wassergehalt) gelöst. Der DMSO/Wasser-Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 10 Tage unter Einfluss von Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm gerührt (UV-Lampe, Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch, Deutschland, Abstand zum Quarzkolben: 10 cm). Anschließend wurde der Ansatz mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser 70:30) aufgereinigt. Es wurde weißes Pulver (23 mg) erhalten. Die NMR-Spektren zeigten teilweise bei einer Messtemperatur von -39.9 °C ein Isomerenverhältnis von 1:0.4 auf.

Schmp. 140 – 146 °C (Zers.); IR (KBr): 3423 cm⁻¹ (br), 1708 cm⁻¹, 1680 cm⁻¹, 1637 cm⁻¹, 1591 cm⁻¹, 1524 cm⁻¹, 1401 cm⁻¹, 1384 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, -39.9 °C) δ (ppm) = 1.72 (br s, 3H), 1.99 – 2.13 (m, 4H), 2.43 (br s, 2H), 2.44 – 2.66 (m, 4H), 2.95 – 3.09 (m, 4H), 3.28 – 3.35 (m, 3H), 3.35 – 3.38 (m, 1H), 7.29 – 7.47 (m, 11H), 9.20 (br s, 1H), 9.27 (br s, 1H); ¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-d₆, -39.9 °C) δ (ppm) = 20.6/21.4 (CH₃), 23.1/23.1, 29.7/29.9, 34.5 (CH₂), 121.0/121.1 (2C), 121.3/121.4, 125.2, 126.5, 128.4, 128.5/128.5, 129.1/129.1 (2C), 129.6, 129.7, 129.9 (CH), 76.6/76.8/76.8, 128.8/128.8, 129.6, 129.7, 129.9, 135.5/135.5, 136.1, 136.2, 137.0/137.0, 137.9, 138.4, 145.6/145.7, 157.5/157.6, 167.1/167.2, 167.3, 204.5/204.7; HPLC (grad.): 98.8% bei 254 nm, t_m = 1.1 min, t_{ms} = 12.8 min (System 3).

10.4 Biologische Assays

KinaseGlo Plus Assay zur Testung der Inhibition von *Pf*GSK-3 und *Hs*GSK-3

Die Kinase-Assays der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47** wurden von Dr. Arne Alder unter der Leitung von Prof. Dr. Tim W. Gilberger am *Centre for Structural Systems Biology* in Hamburg durchgeführt. Der Lumineszenz-basierte Kinase-Assay (KinaseGlo Plus, Promega, Madison, WI) wurde für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von *Pf*GSK-3 und *Hs*GSK-3 sowie der Untersuchung potenzieller Kinase-Inhibitoren genutzt. Dieser sichert bei ATP-Konzentrationen von bis zu 100 µM ein lineares Lumineszenz-Signal sowie eine hohe Signalstabilität zu. Zuerst wird die Kinasereaktion der zu untersuchenden Kinase in Gegenwart von ATP und eines Substrats durchgeführt. Dabei wird ATP bei der Substratphosphorylierung in Abhängigkeit der Kinaseaktivität verbraucht. Die im KinaseGlo Reagent enthaltene Luciferase erzeugt anschließend Lumineszenz. Die Signalintensität ist von der Menge des im Reaktionsansatz verbliebenen ATPs abhängig und zeigt so invers proportional die enzymatische Aktivität. Für die Kinasereaktion stellten sich folgende Reaktionsbedingungen als optimal dar: *rPf*GSK-3 (s. 3.2.5) bzw. *rHs*GSK-3 (Promega, Madison, WI) (20 ng), GS-1 Substrat (Promega, Madison, WI) (12 µg) und ATP (6 µg) (Ultra Pure, Promega, Madison, WI) in 1 x Kinase-Reaktionspuffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA; finales Reaktionsvolumen 5 µL). Die Kinasereaktion wurde bei 30 °C für 30 min durchgeführt. Danach folgten die Zugabe von KinaseGlo Reagent (5 µL) sowie die Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Überführung des Ansatzes in weiße 384-Well Platten (NUNC, ThermoFisher, Waltham, MA), wurde das Lumineszenz-Signal mit einem EnVision Multilable Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA) (*Integration time* 0.5 sec/well) detektiert. Zur Vermessung potenzieller Kinase-Inhibitoren wurden diese zunächst in DMSO in Lösung gebracht und anschließend der Kinasereaktion hinzugefügt. Dabei lag die Endkonzentration an DMSO in der Kinasereaktion bei maximal 1%. Außerdem wurde DMSO (1%) ohne Substanz als Negativkontrolle verwendet.

Ebenso wurde aufgrund der inversen Proportionalität des Lumineszenzsignals zur ATP-Konzentration eine Kontrollreaktion (Reaktion ohne Kinase) vermessen, um so 100% ATP bestimmen zu können. Die Differenz des Lumineszenzsignals zwischen Kinasereaktion und Kontrollreaktion stimmt mit der Kinase-Aktivität überein. Mit GraphPad Prism (Version 6) wurden die Messwerte geplottet und zur DMSO-Kontrolle normalisiert.

Produktion der rekombinanten *PfGSK3*

Die Kinaseassays der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47** wurden von Dr. Arne Alder unter der Leitung von Prof. Dr. Tim W. Gilberger am *Centre for Structural Systems Biology* in Hamburg durchgeführt. Hierfür wurde die *PfGSK3* mittels ligationsunabhängiger Klonierung (InFusion, Takara Clontech) in einen pOPIN J-Expressionsvektor³⁴⁹ kloniert.

Der Expressionsvektor wurde in *E.coli* BL21 (DE3)-RIL transformiert und die Expression der rekombinanten *PfGSK3*-6xHis-GST wurde durch Inkubation mit 2 mM IPTG für 5 h bei 37 °C induziert. Das rekombinante Protein wurde mittels Affinitäts-Chromatographie (Glutathion-Sepharose, GenScript, Piscataway, NJ, USA) aufgereinigt. Die Elution wurde mittels Verdau mit humaner Rhinovirus 3C Protease durchgeführt (zur Verfügung gestellt von Dr. Sophia Reindl, BNITM).

HEK293T-Zell basierter Zytotoxizitätstest

Die Viabilitätsassays der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47** wurden von Dr. Arne Alder unter der Leitung von Prof. Dr. Tim W. Gilberger am *Centre for Structural Systems Biology* in Hamburg durchgeführt. Zur Untersuchung auf Zytotoxizität der Thieno[2,3-*b*]pyridincarbamide auf eukaryotische Zellen wurde ein HEK293T-Zell-Viabilitätsassay verwendet. Zuvor wurde hierfür die Zelldichte einer HEK293T-Kultur mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nach Aussäen der Zellen in schwarze 96-*well*-Platten (lumox® *multiwell* 96 Zellkulturplatte, Sarstedt, DE) (2.5×10^4 Zellen pro *well* mit einem Volumen von 200 µL), wurden diese für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt. Es wurde erneut frisches Kulturmedium (200 µL) dazugegeben, in welches zuvor die zu testenden Substanzen hinzugefügt wurden. Um die Substanzen in Lösung zu bringen, wurde abermals DMSO verwendet. Die Endkonzentration an DMSO im Assay betrug dabei höchstens 0.5%. Zusätzlich wurde DMSO (0.5%) als Negativkontrolle und DMSO (10%) als Positivkontrolle genutzt. Nachdem die zu testenden Substanzen dem Ansatz hinzugefügt wurden, wurde erneut für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Mittels PrestoBlue® Cell Viability Agent (Invitrogen, Carlsbad, CA) wurde die Zellviabilität getestet. Dafür wurde nach Abnahme des Überstands PrestoBlue® (10%) in vorgewärmtem PBS hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Ein aktiver Stoffwechsel der Zellen führt zur Reduktion und somit zur Fluoreszenz des PrestoBlue-Farbstoffs.

Diese wurde mit einem EnVision Multilable Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA) (*Integration time* 0.1 sec/well) bei $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ vermessen. Mit GraphPad Prism (Version 6) wurden die Messwerte geplottet und zur DMSO-Kontrolle normalisiert.

Proliferationsassay zur Testung der antiplasmodialen Aktivität

Die Proliferationsassays der 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide **46** und **47** wurden von Dr. Arne Alder unter der Leitung von Prof. Dr. Tim W. Gilberger am *Centre for Structural Systems Biology* in Hamburg durchgeführt. Die Quantifizierung des DNA-Gehalts infizierter Erythrozyten gibt Aufschluss über die Proliferation von Plasmodien, da Erythrozyten selbst keine DNA enthalten. Die Parasiten-DNA wird dabei mit SYBR-Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA) angefärbt. Zunächst wurde dafür die Parasitämie einer Parasitenkultur mit Hilfe der Durchflusszytometrie (ACEA Novo Cyte 1000, ACEA Biosciences, San Diego, CA) ermittelt.³⁵⁰ Anschließend wurde die Kultur in lichtundurchlässige schwarze 96-well-Platten (lumox® *multiwell* 96 Zellkulturplatte, Sarstedt, DE) (200 μL Kultur/well) mit einer Parasitämie von 0.1% und einem Hämatokrit von 2% verteilt. Die potenziell antiplasmodialen Substanzen wurden in DMSO in Lösung gebracht und danach der Kultur beigemischt. Die Endkonzentration an DMSO betrug maximal 0.5%. DMSO ohne Substanz sowie uninfizierte Erythrozyten wurden zusätzlich als Kontrolle genutzt. Nach Inkubation der Kultur für 96 h unter Standardbedingungen (Parasiten in RPMI Kompletmedium³⁵¹ [1.587% (m/v) RPMI 1640, 12 mM NaHCO_3 , 6 mM D-Glucose, 0.2 mM Hypoxanthin, 0.4 mM Gentamicin, 0.5% (w/v) Albumax II, in H_2O sterilfiltriert und auf pH 7.2 mit NaOH gebracht] mit 2% humanen Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rh⁺ in Gegenwart von CO_2 (5%), O_2 (1%) und N_2 (94%) bei 37 °C), konnte der DNA-Gehalt des Parasiten mittels SYBR-Gold-Färbung quantifiziert werden. Hierfür wurden zuvor 100 μL des Kulturüberstands abgenommen, 100 μL SYBR-Gold-Lysepuffer hinzugefügt und resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur konnte die Färbung der DNA mit dem EnVision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA) vermessen werden.³⁵² Anhand von Verdünnungsreihen (10 nM – 10 μM) der Substanzen konnten die IC_{50} -Werte bestimmt werden. Dabei wurden die erhaltenen Messwerte zur Negativkontrolle (uninfizierte Erythrozyten) normalisiert, als Prozent der DMSO-Kontrolle in GraphPad Prism (Version 6) geplottet und *dose-response*-Kurven mittels nichtlinearer Regression (*curve fit > dose-response-inhibition > (log) inhibitor vs. normalized response - variable slope*) erstellt.

Tabelle 10-23: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays.

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei			IC ₅₀ [nM]	HEK293T Viabilität	rPfGSK3-Aktivität	HsGSK3-Aktivität
	30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]		bei 30 µM [%]	bei 10 µM [%]	bei 10 µM [%]
46a	11.0 ± 11.1	13.9 ± 9.9	71.9 ± 26.3	n. b.*	93.9 ± 6.5	101.8 ± 4.0	n. b.*
46b	3.4 ± 5.6	9.9 ± 13.7	14.0 ± 11.3	192.5	89.0 ± 15.8	99.9 ± 5.0	103.3 ± 3.4
46c	3.1 ± 4.9	17.9 ± 15.1	29.5 ± 16.5	71.6	92.7 ± 11.7	104.0 ± 15.5	105.3 ± 4.6
46d	1.6 ± 3.4	15.5 ± 17.4	9.2 ± 5.7	n. b.*	24.4 ± 14.9	106.5 ± 10.6	n. b.*
46e	8.0 ± 8.3	10.0 ± 12.9	11.5 ± 11.6	n. b.*	57.9 ± 20.6	103.1 ± 10.7	n. b.*
46f	9.1 ± 11.4	8.0 ± 12.9	14.6 ± 16.1	19.2	72.4 ± 23.4	102.8 ± 6.2	102.5 ± 9.5
46g	9.0 ± 9.6	12.9 ± 14.6	11.0 ± 10.1	25.3	56.9 ± 31.3	100.8 ± 5.5	105.5 ± 6.2
46h	7.3 ± 9.0	8.7 ± 13.5	14.1 ± 12.3	n. b.*	44.1 ± 22.5	105.9 ± 5.3	n. b.*
46i	3.1 ± 2.6	51.9 ± 21.0	98.2 ± 18.8	n. b.*	87.6 ± 19.6	106.2 ± 8.0	n. b.*
46j	5.0 ± 5.9	88.6 ± 21.7	90.5 ± 23.1	n. b.*	95.8 ± 9.8	108.1 ± 10.4	n. b.*
46k	6.3 ± 6.6	11.2 ± 8.9	51.4 ± 24.9	n. b.*	84.3 ± 14.3	105.8 ± 18.7	n. b.*
46l	3.9 ± 2.3	6.0 ± 6.9	17.8 ± 14.4	55.5	68.4 ± 24.3	103.0 ± 12.9	107.0 ± 4.1
47a	1.3 ± 1.9	3.7 ± 3.6	23.1 ± 10.8	410	123.0 ± 8.4	80.3 ± 18.2	89.7 ± 6.9
47b	17.4 ± 24.9	46.0 ± 19.7	96.0 ± 1.9	n. b.*	101.1 ± 19.6	101.9 ± 16.5	n. b.*
47c	4.2 ± 2.1	40.0 ± 15.9	69.2 ± 26.0	n. b.*	99.3 ± 5.3	99.0 ± 14.1	n. b.*
47d	2.2 ± 2.8	3.5 ± 3.5	88.5 ± 17.6	n. b.*	83.0 ± 21.6	69.7 ± 16.6	n. b.*
47e	2.8 ± 2.7	5.6 ± 5.5	9.7 ± 6.8	273	83.3 ± 20.6	105.6 ± 6.5	93.3 ± 3.8
47f	4.7 ± 4.2	51.6 ± 15.7	80.2 ± 20.3	n. b.*	93.6 ± 29.9	90.9 ± 14.2	n. b.*
47g	3.3 ± 3.1	3.1 ± 2.7	63.8 ± 16.5	n. b.*	67.8 ± 8.1	74.8 ± 21.7	n. b.*
47h	3.0 ± 3.0	3.9 ± 2.9	63.2 ± 19.5	n. b.*	90.7 ± 13.2	103.5 ± 13.3	n. b.*

Tabelle 10-24: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays (Fortsetzung 1).

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei			IC ₅₀ [nM]	HEK293T Viabilität	rPfGSK3-Aktivität	HsGSK3-Aktivität
	30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]		bei 30 µM [%]	bei 10 µM [%]	bei 10 µM [%]
47i	3.3 ± 2.0	6.1 ± 4.9	65.8 ± 24.6	n. b.*	39.9 ± 14.6	70.9 ± 19.8	n. b.*
47k	22.1 ± 6.4	93.5 ± 28.2	94.8 ± 28.6	n. b.*	67.2 ± 21.5	15.4 ± 10.7	87.6 ± 7.4
47l	3.6 ± 3.7	84.5 ± 28.4	85.1 ± 28.2	n. b.*	54.3 ± 19.1	84.7 ± 10.6	n. b.*
47m	13.4 ± 7.8	68.4 ± 22.6	85.8 ± 22.0	n. b.*	70.6 ± 23.0	54.1 ± 15.5	94.3 ± 5.2
47n	13.3 ± 10.0	67.3 ± 21.1	86.9 ± 15.7	n. b.*	74.3 ± 31.1	32.7 ± 7.3	93.8 ± 2.1
47o	11.7 ± 4.6	69.1 ± 21.5	81.1 ± 25.9	n. b.*	70.9 ± 23.6	32.9 ± 12.9	93.9 ± 3.2
47p	4.5 ± 5.7	30.4 ± 13.8	85.4 ± 23.5	n. b.*	25.2 ± 18.7	60.0 ± 11.2	n. b.*
47q	3.1 ± 2.4	5.4 ± 3.2	48.3 ± 18.0	n. b.*	103.9 ± 14.1	111.0 ± 12.1	n. b.*
47r	2.5 ± 3.2	4.9 ± 3.0	6.5 ± 3.1	n. b.*	-13.1 ± 5.4	72.6 ± 12.8	n. b.*
47s	3.0 ± 1.7	2.8 ± 3.6	45.7 ± 17.2	n. b.*	104.7 ± 10.0	108.4 ± 16.5	n. b.*
47t	4.0 ± 4.6	4.8 ± 5.0	78.3 ± 15.2	n. b.*	114.0 ± 40.3	112.9 ± 15.9	n. b.*
47u	5.1 ± 3.2	60.6 ± 23.7	68.9 ± 27.3	n. b.*	99.0 ± 22.6	105.1 ± 6.6	n. b.*
47v	3.5 ± 1.4	53.1 ± 29.6	74.5 ± 21.2	n. b.*	87.0 ± 26.7	109.9 ± 6.2	n. b.*
47w	2.2 ± 1.5	6.2 ± 6.1	51.8 ± 38.6	1471	92.3 ± 18.8	91.8 ± 18.7	100.6 ± 2.5
47x	5.8 ± 4.5	3.6 ± 2.4	50.1 ± 37.9	860	76.1 ± 17.3	95.3 ± 8.6	91.7 ± 5.7
47y	4.2 ± 3.8	8.7 ± 6.6	59.0 ± 43.6	n. b.*	86.1 ± 16.0	90.2 ± 8.9	n. b.*
47z	3.2 ± 1.1	5.5 ± 4.6	36.6 ± 27.4	699	81.7 ± 19.6	110.0 ± 7.7	97.8 ± 5.9
47aa	2.5 ± 1.8	6.4 ± 5.8	73.1 ± 22.1	n. b.*	91.9 ± 13.6	108.6 ± 4.9	n. b.*
47ab	2.6 ± 1.8	5.3 ± 2.6	61.8 ± 27.7	n. b.*	74.0 ± 8.6	101.1 ± 3.7	n. b.*

Tabelle 10-25: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3-*b*]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays (Fortsetzung 2).

Verbindung	Parasitämie von 3D7 bei			IC ₅₀ [nM]	HEK293T Viabilität	rPfGSK3-Aktivität	HsGSK3-Aktivität
	30 µM [%]	3 µM [%]	0.3 µM [%]		bei 30 µM [%]	bei 10 µM [%]	bei 10 µM [%]
47ac	3.5 ± 9.2	8.2 ± 10.4	26.8 ± 19.5	n. b.*	-1.4 ± 13.1	112.2 ± 13.9	n. b.*
47ad	3.3 ± 0.9	7.5 ± 5.9	30.1 ± 14.2	n. b.*	55.8 ± 25.1	85.7 ± 8.2	n. b.*
47ae	3.9 ± 0.8	13.3 ± 9.9	57.7 ± 24.1	n. b.*	76.3 ± 24.1	95.0 ± 10.7	n. b.*
47af	2.6 ± 2.9	7.6 ± 7.5	5.8 ± 4.2	n. b.*	-8.5 ± 7.4	100.9 ± 20.2	n. b.*
47ag	3.7 ± 6.1	5.4 ± 6.7	5.6 ± 4.7	n. b.*	-7.4 ± 6.4	107.1 ± 11.2	n. b.*

* n. b. = nicht bestimmt

10.5 Vorhersage der physikochemischen Eigenschaften

Die clogP-Werte wurden mit dem Programm MarvinSketch (Version 20.17)³²⁶ vorhergesagt. Dabei wurden die Modelle nach VISWANADHAN *et al.*³⁵³, KLOPMAN *et al.*³⁵⁴, CSIZMADIA *et al.*³⁵⁵ und der PhysProp Datenbank³⁵⁶ genutzt. Weitere physikochemische Parameter wurden mit dem Programm SwissADME³²⁷ ermittelt. Die clogS-Werte nach DELANEY *et al.*²⁵⁸ wurden ebenfalls mit SwissADME³²⁷ berechnet. Die clogS-Werte nach ALI *et al.*²⁵⁹ und JAIN und YALKOWSKY²⁵³ wurden mit den angegebenen Formeln ermittelt.

10.6 Löslichkeitsuntersuchungen

10.6.1 Thermodynamische Löslichkeit

Die thermodynamische Löslichkeit wurde mit einer im Arbeitskreis etablierten *shake-flask*-Methode ermittelt.³³² Dazu wurden zwei Ansätze mit etwa 500 µg der zu untersuchenden Verbindung in ein Whatman Mini-UniPrep® Vial (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingewogen und 400 µL des natriumchloridhaltigen Phosphatpuffers pH 7.4 (hergestellt gemäß Ph. Eur. 9.8, Phosphatpuffer pH 7.4, natriumchloridhaltig) hinzugegeben. Hierfür wurden 2.38 g Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat, 0.19 g Kaliumdihydrogenphosphat und 8.0 g Natriumchlorid in dest. Wasser (1000 mL) gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von konzentrierter Schwefelsäure eingestellt. Anschließend wurden die Proben mit dem Filteraufsatz locker verschlossen und mit Parafilm® (Parafilm M, Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA) umschlossen. Die Proben wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in einem Schüttelinkubator (IKA® KS 3000 ic control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) bei 25 °C und 400 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem integrierten Filter filtriert und mittels der bei den entsprechenden Substanzen angegebenen ACN/Wasser-Gemische mit der HPLC (System 1 Merck Hitachi LaChrom Elite®, Merck, Darmstadt, Deutschland, isokratische Methode) vermessen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich von den Verbindungen, bei denen ein Signal detektiert werden konnte, eine separate Kalibriergerade erstellt. Hierzu wurden entsprechend des Löslichkeitsbereichs der Verbindungen genau definierte Konzentrationslösungen der jeweiligen Verbindung in DMSO hergestellt und auf die gleiche Weise vermessen. Das Integral des Signal-Peaks korreliert mit der Konzentration der Verbindung. Die quantitative Auswertung erfolgte bei zwei Wellenlängen (254 nm und 280 nm). Aus der Kalibriergeraden wurde anschließend die Konzentration des in Lösung gegangenen Anteils der Verbindung ermittelt, welche die thermodynamische Löslichkeit darstellt.

10.6.2 Kinetische Löslichkeit

Die kinetische Löslichkeit wurde mittels Laser-Nephelometrie bestimmt. Hierfür wurde das NEPHELOstarPlus Nephelometer (BMG LabTech, Ortenberg, Deutschland) verwendet. Die Wellenlänge des Geräts wurde auf 635 nm, die Strahlenbündelung auf 2.50 mm und die Intensität des Laserstrahls auf 80% gemäß SOP festgelegt. Zunächst wurden die 96-*well*-Platten (CorningTM UV-transparente *flat-bottom*-Mikrotiterplatte; Fa. Corning Incorporated, Kennebunk, ME, USA) ohne Inhalt vermessen, um den Hintergrund zu quantifizieren, der später von jedem Wert in dem individuellen *well* subtrahiert wurde. Anschließend wurde jede Verbindung mindestens viermal vermessen. Hierfür wurden zwei unabhängige Stammlösungen in Konzentrationen von 5 bis 10 mM in DMSO hergestellt. Von jeder Stammlösung wurden zwei Verdünnungsreihen erstellt. Von **46i** und **46j** wurden drei bzw. fünf Einwaagen jeweils einmal vermessen. Auf Grundlage von Vorexperimenten wurden die Verdünnungen so gewählt, dass mindestens drei Konzentrationen sowohl unterhalb als auch oberhalb des erwarteten *kick-off*-Punkts vermessen wurden. In die 96-*well*-Platte wurde hierfür 198 µL Phosphatpuffer (pH 7.4) vorgelegt. Anschließend wurden 2 µL der entsprechenden Verdünnungsstufe, die gelöst in DMSO vorlag, oder 2 µL DMSO (entspricht 1%) zur Detektion des *blank*-Werts, hinzugefügt. Vor der Messung wurde die Platte in dem Gerät bei 25 °C für 10 Sekunden geschüttelt (500 Umdrehungen/Minute (Doppelorbital)) und direkt im Anschluss bei 25 °C vermessen. Der Phosphatpuffer wurde in Anlehnung an die Ph. Eur. 9.8 nach der Vorschrift *Phosphat-Pufferlösung pH 7.4, natriumchloridhaltig* hergestellt. Hierfür wurden 2.38 g Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat, 0.19 g Kaliumdihydrogenphosphat und 8.0 g Natriumchlorid in dest. Wasser (1000 mL) gelöst. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von konzentrierter Schwefelsäure eingestellt. In Folge von Präzipitationen kann der Laserstrahl gestreut werden. Bei keiner Trübung wird dementsprechend keine Streuung gemessen, sodass hier eine horizontal verlaufende Basislinie detektiert wird. Ab Messung einer Trübung ergibt sich eine konstant ansteigende Gerade, da die Intensität der Streuung proportional zur Menge an ungelöstem Feststoff ist. Die Intensität der Streuung wird gemessen und gegen die Konzentration der Probe aufgetragen. Die Bestimmung des *kick-off*-Punkts erfolgte mit Microsoft Excel (Version 2013), in dem zwei Ausgleichsgraden erstellt wurden. Der x-Wert des Schnittpunkts beider Geraden stellt die kinetische Löslichkeit dar. Bei Vermessung von zwei unabhängigen Proben wurde der Bereich beider Werte in Klammern angegeben. Bei Vermessung von mehr als zwei unabhängigen Proben wurde die Standardabweichung abgegeben.

10.7 Stabilitätsuntersuchungen

10.7.1 Probenpräparation unter Lichtausschluss

46f wurde in ein Whatman Mini-UniPrep[®] Vial (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingewogen (etwa 300-400 µg) und in DMSO (HPLC-Reinheit) oder DMSO (HPLC-Reinheit)-Wasser gelöst.

Hierfür wurde die Substanz zunächst in DMSO gelöst und anschließend vorsichtig Wasser hinzugegeben. Die finale Konzentration der Lösungen betrug 2.5 mM. Die Wasserkonzentration der Gemische betrug zehn Prozent. Die Probengefäße wurden mit Aluminiumfolie zum Ausschluss von Licht umhüllt und der Verschluss mit Parafilm abgedichtet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur (19 – 24 °C) und bei 40 °C. Die Proben wurden in definierten Zeitabständen (die ersten drei Tage täglich, anschließend wöchentlich und die letzten zwei Monate zweiwöchentlich) über eine Gesamtdauer von etwa sechs Monaten mittels HPLC (System 3, Gradientenmethode, Auswertung bei 254 nm und 280 nm) vermessen.

10.7.2 Probenpräparation unter Lichteinfluss

46f wurde in einen Quarzkolben eingewogen (60-80 mg) und in DMSO-Wasser gelöst. Dabei wurde die Verbindung zunächst in DMSO (HPLC-Reinheit) gelöst und anschließend Wasser hinzugegeben. Die finale Konzentration der Lösungen betrug 30 mM. Die Wasserkonzentration betrug fünf Prozent. Die Probe wurde für zehn Tage mit Licht einer Wellenlänge von 366 nm (UV-Lampe, Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch, Deutschland) bei Raumtemperatur (21 °C) bestrahlt. Dabei lag die Probentemperatur zwischen 24 – 27 °C. Die Proben wurden täglich über eine Gesamtdauer von zehn Tagen mittels HPLC (System 3, Gradientenmethode, Auswertung bei 254 nm und 280 nm) vermessen. Anschließend wurde die Probe mittels präparativer HPLC (ACN/Wasser 65:35) aufgereinigt.

11 Verzeichnisse

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Der parasitäre Entwicklungszyklus modifiziert nach COWMAN <i>et al</i>	5
Abbildung 1-2: Arylaminoalkohole	8
Abbildung 1-3: 4-Aminochinoline	9
Abbildung 1-4: Antifolate	11
Abbildung 1-5: Atovaquon (15)	12
Abbildung 1-6: 8-Aminochinoline	13
Abbildung 1-7: Für die Malariatherapie genutzte Antibiotika	14
Abbildung 1-8: Artemisinin (20) und Derivate	15
Abbildung 1-9: Neue Wirkstoffe gegen Malaria: Das Trioxolan Artefenomel (26)	17
Abbildung 1-10: Der neue Wirkstoff Ganaplacide (29)	18
Abbildung 1-11: Cipargamin (31)	18
Abbildung 1-12: Der Dihydroorotat-Dehydrogenase-Inhibitor DSM265	19
Abbildung 1-13: MMV048 (35) als potenzieller PfPI4K-Inhibitor	20
Abbildung 1-14: A : Kokristallstruktur der humanen GSK-3	23
Abbildung 1-15: Manzamin A (37) und 8-Hydroxymanzamin A (38)	29
Abbildung 1-16: Löslichkeitsverbesserung von DDD102542 (39)	38
Abbildung 2-1: Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit geplanten Strukturmodifikationen	41
Abbildung 3-1: Visualisierung der untersuchten Bindetaschen der unterschiedlichen Homologiemodelle	44
Abbildung 3-2: Darstellung der Kokristallstruktur des Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridins 36 in der Bindetasche der HsGSK-3 β	45
Abbildung 3-3: Visualisierung der Oberflächenstrukturen der Bindetasche und des Liganden 36	46
Abbildung 3-4: Durch <i>docking</i> mit GOLD vorhergesagter Bindungsmodus von 39b in der PfGSK-3	47
Abbildung 3-5: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugte hypothetische Position von 39b in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3	47
Abbildung 3-6: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von 42 in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3	48
Abbildung 3-7: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugte hypothetische Position von 42 in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3	49
Abbildung 3-8: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von 46f in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3	50

Abbildung 3-9: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugte hypothetische Position von 46f in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3.....	50
Abbildung 3-10: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugter hypothetischer Bindungsmodus von 47k in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3	51
Abbildung 3-11: Durch <i>docking</i> mit GOLD erzeugte hypothetische Position von 47k in der ATP-Bindetasche der PfGSK-3.....	52
Abbildung 4-1: ¹ H-NMR-Spektrum (DMSO- <i>d</i> ₆) von 52f	56
Abbildung 4-2: Einfluss der 5- und 6-Position auf die Stabilität des 1,4-Dihydropyridins 77 gegenüber oxidativen Prozessen, nach LITVINOV <i>et al</i>	63
Abbildung 4-3: Eintopf-Synthese aus 48c , 59 und 60	66
Abbildung 4-4: Röntgenkristallanalyse des detektierten Nebenprodukts 81a	69
Abbildung 4-5: ¹ H, ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von 84	76
Abbildung 4-6: Massenspektrum (APCI pos., TLC) von 82h (A) und 86 (B).....	77
Abbildung 4-7: ¹³ C-NMR-Spektrum von 82d	78
Abbildung 4-8: Röntgenkristallstrukturanalyse von 46d	85
Abbildung 4-9: Die Boc-entschützte Cyclopentan-anellierte Verbindung 93 und die detektierte Verunreinigung 94	86
Abbildung 4-10: ¹ H-NMR-Spektren von dem Gemisch aus 93 und 94 (A) und der isolierten Verbindung 94 (B)	87
Abbildung 4-11: Ausschnitt des DEPT135-Spektrums A und des ¹³ C-NMR-Spektrums B von 46l	89
Abbildung 4-12: IR-Spektrum der Verbindung 46j	90
Abbildung 4-13: HSQC-NMR-Spektrum von 46a	91
Abbildung 4-14: DSC-Thermogramm von 47l	92
Abbildung 4-15: HPLC-Chromatogramm (isokratische Methode ACN/H ₂ O 60:40) von 47h	96
Abbildung 4-16: HPLC-Chromatogramm (isokratische Methode ACN/H ₂ O 60:40) von 47h	97
Abbildung 5-1: Detektierte HPLC-Reinheit der Stabilitätsuntersuchungen von 46f	99
Abbildung 5-2: Stabilitätsuntersuchung von 46f unter Lichtbestrahlung	100
Abbildung 6-1: Übersicht der modifizierten Positionen der 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide.....	101
Abbildung 6-2: Proliferationsassays an <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten unter Zusatz der Verbindungen 47a-47i	103
Abbildung 6-3: Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen 47a-47i	103
Abbildung 6-4: Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen 47a-47i	104
Abbildung 6-5: Proliferationsassays an <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen 47q-47ag	106

Abbildung 6-6: Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen 47q-47ag	106
Abbildung 6-7: Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen 47q-47ag	107
Abbildung 6-8: Proliferationsassays an <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen 47k-47p	108
Abbildung 6-9: Zytotoxizitätsassay mit den Verbindungen 47k-47p	109
Abbildung 6-10: Kinase-Aktivitäts-Assay mit den Verbindungen 47k-47p	110
Abbildung 6-11: Proliferationsassays an <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten mit den Verbindungen 46a-46l	113
Abbildung 6-12: Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays mit den Verbindungen 46a-46l	113
Abbildung 6-13: Ergebnisse der Kinase-Aktivitätsassays mit den Verbindungen 46a-46l	114
Abbildung 6-14: Verbindungen, für die ein IC ₅₀ -Wert an <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten ermittelt wurde	115
Abbildung 7-1: Darstellung einer Löslichkeitsmessung zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit der gut löslichen Verbindung 46i mittels Nephelometrie	125
Abbildung 7-2: Darstellung einer Löslichkeitsmessung zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit der schlecht löslichen Verbindung 46f mittels Nephelometrie.....	126
Abbildung 8-1: Beispiele für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen auf Grundlage der bekannten Verbindungen 39b und 42	133
Abbildung 9-1: Examples for the compounds synthesized in this thesis based on the known compounds 39b and 42	135
Abbildung 10-1: Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d	150
Abbildung 10-2: Röntgenkristallstruktur von zwei unabhängigen Molekülen der Struktur 81a	213
Abbildung 10-3: Röntgenkristallgitterstruktur der wellenförmig angeordneten Verbindung 81a	214

11.2 Formelverzeichnis

Formel 1-1: Löslichkeitsvorhersage nach JAIN und YALKOWSKY	35
Formel 1-2: Vorhersage der Löslichkeit mittels ESOL-Gleichung nach DELANEY	36
Formel 1-3: Löslichkeitsvorhersage nach ALI <i>et al.</i>	36
Formel 1-4: Löslichkeitsabschätzung nach HILL und YOUNG.....	37
Formel 1-5: Modifizierte Henderson-Hasselbalch-Gleichung zur Abschätzung der Löslichkeit	37
Formel 1-6: Gleichung für die Berechnung der LE	38
Formel 1-7: Berechnung der <i>lipophilic ligand efficiency</i> (LLE).....	39
Formel 4-1: Savitsky-Golay-Funktion mit den festgelegten Faktoren im HPLC-System 1.....	93

11.3 Schemataverzeichnis

Schema 4-1: Syntheseschritte zur Darstellung der 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 50	53
Schema 4-2: Synthese der 4-(<i>N,N</i> -Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde 52	54
Schema 4-3: Reaktion von 48a und 53	55
Schema 4-4: Synthese der Acetamid-Derivate 55 nach einer abgewandelten Synthese von CHO <i>et al</i>	57
Schema 4-5: Synthese der 4-Aryl-1,2-dihydropyridin-2-thione 58 , nach einer Vorschrift von SHARANIN <i>et al</i>	57
Schema 4-6: Reaktionsmechanismus der Eintopf-Synthese	59
Schema 4-7: Postulierter reduktiver Verbrauch des Knoevenagel-Intermediats	59
Schema 4-8: Gewählte Reaktionsbedingungen von GUO <i>et al</i>	60
Schema 4-9: Eintopf-Synthese aus Aldehyd 48 mit stark elektronenschiebenden Substituenten	61
Schema 4-10: Reaktionsverlauf bei der Synthese von 58i aus 48b mit 2-Cyanthioacetamid 59 und Malonsäuredinitril 60 , nach MASCH	61
Schema 4-11: Reaktion von 73 mit 59 führt zum Austausch der Komponenten, nach DYACHENKO <i>et al</i>	62
Schema 4-12: Beschriebene Dimerbildungen der 1,4-Dihydropyridinthiolate 62 , nach DYACHENKO <i>et al</i>	62
Schema 4-13: Oxidation der 1,4-Dihydropyridinform 75 zu 76	63
Schema 4-14: Alkylierung von 78 zu 79 und anschließende Thorpe-Ziegler-Zyklisierung	64
Schema 4-15: Rezyklisierung von Thiopyranen 81 zu 58 unter Einwirkung von Wärme, nach SHARANIN <i>et al</i>	65
Schema 4-16: Postulierte Ringöffnung von 81 und Bildung der Edukte bei Anwesenheit von Wasser, nach SHARANIN <i>et al</i>	65
Schema 4-17: Versuch zur Darstellung von 58i	70
Schema 4-18: Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide 61 aus 48 und 59 sowie die beschriebene temperaturabhängige Dimerisierungsreaktion zu 87 , nach BRUNSKILL <i>et al</i>	71
Schema 4-19: Postulierter Reaktionsmechanismus aus 61 und 59 zum Pyridinthion 58 , nach SHARANIN <i>et al</i>	71
Schema 4-20: Synthese der 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide 61 aus 48 und 59 , nach BRUNSKILL <i>et al</i>	72
Schema 4-21: Synthese von 61b aus 48d und 59 und dabei isoliertes Nebenprodukt 58d	73
Schema 4-22: Reaktionsabfolge des 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamids 61 mit 83 , modifiziert nach ELNAGDI <i>et al</i>	74
Schema 4-23: Oxidation von 85 zu 82a unter reduktivem Verbrauch des Knoevenagel-Intermediats	75

Schema 4-24: Oxidation von zwei Molekülen 82h zu dem Dimer 86	77
Schema 4-25: Alkylierung von 49 und Reaktionsmechanismus der Thorpe-Ziegler-Zyklisierung zur Darstellung der 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridine 50 , nach LITVINOV <i>et al</i>	79
Schema 4-26: Darstellung von 50 ausgehend von 81 , nach DYACHENKO <i>et al</i>	80
Schema 4-27: Synthese der 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 50	80
Schema 4-28: Reaktion von 58b und 55f zu 89	84
Schema 4-29: Darstellung von 47j ausgehend von 81a , modifiziert nach DYACHENKO <i>et al</i>	88

11.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht über die von der WHO empfohlenen Artemisinin-Kombinationstherapien.....	14
Tabelle 1-2: Inhibition der <i>Pf</i> GSK-3 resp. <i>Ss</i> GSK-3 durch ausgewählte Thieno[2,3- <i>b</i>]pyridine (Daten aus FUGEL <i>et al</i>	30
Tabelle 1-3: Antiplasmodiale Aktivität ausgewählter Verbindungen aus den Arbeiten von MASCH.....	31
Tabelle 1-4: Antiplasmodiale Aktivität ausgewählter Verbindungen aus den Arbeiten von MASCH (Fortsetzung)	32
Tabelle 4-1: Synthetisierte 4-(<i>N,N</i> -Dialkylamino)-2-chlorbenzaldehyde 52a-e	54
Tabelle 4-2: Synthetisierte aliphatische Acetamid-Derivate 55a-e	57
Tabelle 4-3: Durchgeführte Synthesen zur Optimierung der Pyridinthion-Ausbeute nach GUO <i>et al</i> ..	67
Tabelle 4-4: Mittels Eintopf-Synthese dargestellte Thioxo-1,2-dihydropyridine 58a-58i	68
Tabelle 4-5: Synthetisierte 3-Aryl-2-cyan-2-propenthioamide 61b-61d	72
Tabelle 4-6: Synthetisierte Pyridinthion-Derivate 82a-82i	74
Tabelle 4-7: 6-Alkyl-3-amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 46a-46l	81
Tabelle 4-8: 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanarylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 47a-47ag	82
Tabelle 4-9: 3,6-Diamino-4-aryl-5-cyanarylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 47a-47ag (Fortsetzung)	83
Tabelle 6-1: Parasitämie der mit <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten bei einer Konzentration von 0.3 µM, 3µM und 30 µM der Verbindungen 47a-47i	102
Tabelle 6-2: Parasitämie von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten nach Zugabe von 47q - 47ag ...	105
Tabelle 6-3: Parasitämie von <i>P. falciparum</i> -infizierten Erythrozyten nach Zugabe von 47e und 47k-47p	108
Tabelle 6-4: Substitutionsmuster der Verbindungen 46a - 46l	111
Tabelle 6-5: Parasitämie (<i>P. falciparum</i> 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit 46a-46l	111
Tabelle 6-6: Parasitämie (<i>P. falciparum</i> 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit 46a-46l (Fortsetzung)	112

Tabelle 6-7: Parasitämie (<i>P. falciparum</i> 3D7) von infizierten Erythrozyten nach Inkubation mit 46a-46l	112
Tabelle 7-1: Strukturmodifikationen der Verbindungen 47a-7i	117
Tabelle 7-2: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide 47a-7i	117
Tabelle 7-3: Strukturmodifikationen der Verbindungen 47k-47p	118
Tabelle 7-4: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen 47k-47p	118
Tabelle 7-5: Strukturmodifikationen der Verbindungen 47q-47ag	119
Tabelle 7-6: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen 47q-47ag	120
Tabelle 7-7: Strukturmodifikationen der Verbindungen 46a-46l	121
Tabelle 7-8: Schmelzpunkte und berechnete physikochemische Parameter der Verbindungen 46a-46l	121
Tabelle 7-9: LE- und LLE-Werte der antiplasmodialen Verbindungen	123
Tabelle 7-10: Experimentell ermittelte kinetische und thermodynamische Löslichkeiten sowie die vorhergesagten Löslichkeiten.....	130
Tabelle 7-11: Fortsetzung der experimentell bestimmten kinetischen und thermodynamischen Löslichkeiten sowie die vorhergesagten Löslichkeiten	131
Tabelle 10-1: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von Verbindung 46d	150
Tabelle 10-2: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von Verbindung 46d (Fortsetzung)	151
Tabelle 10-3: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verteilungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d	151
Tabelle 10-4: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verteilungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d (Fortsetzung).....	152
Tabelle 10-5: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d	152
Tabelle 10-6: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d (Fortsetzung)...	153
Tabelle 10-7: Bindungswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d	153
Tabelle 10-8: Bindungswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d (Fortsetzung)....	154
Tabelle 10-9: Torsionswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d	154
Tabelle 10-10: Torsionswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur von Verbindung 46d (Fortsetzung) ...	155
Tabelle 10-11: Wasserstoffbrückenbindungen [\AA und $^\circ$]	155
Tabelle 10-12: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von 81a	214
Tabelle 10-13: Kristalldaten und Strukturverfeinerung von 81a (Fortsetzung)	215

Tabelle 10-14: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a	215
Tabelle 10-15: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a (Fortsetzung)	216
Tabelle 10-16: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a	216
Tabelle 10-17: Bindungslängen [\AA] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a (Fortsetzung) .	217
Tabelle 10-18: Bindungswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a	217
Tabelle 10-19: Bindungswinkel [$^\circ$] der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a (Fortsetzung)...	218
Tabelle 10-20: Torsionswinkel der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a [$^\circ$]	218
Tabelle 10-21: Torsionswinkel der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a [$^\circ$] (Fortsetzung)....	219
Tabelle 10-22: Wasserstoffbrücken der Röntgenkristallstruktur der Verbindung 81a [\AA und $^\circ$].....	220
Tabelle 10-23: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays	233
Tabelle 10-24: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays (Fortsetzung 1)	234
Tabelle 10-25: Synthetisierte 3-Amino-4-arylthieno[2,3- <i>b</i>]pyridin-2-carbamide und die Ergebnisse aus den biologischen Assays (Fortsetzung 2)	235

12 Literaturverzeichnis

- 1 Klebe, G.: Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2009**, S. 12.
- 2 Is malaria eradication possible? *Lancet* **2007**, 370, 1459. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61609-2.
- 3 Global malaria control and elimination: report of a technical review. World Health Organization, Geneva, **2008**. ISBN: 978-92-4-159675-6.
- 4 Murray, C. J. L., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., Andrews, K. G., Foreman, K. J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A. D.: Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **2012**, 379, 413–431. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60034-8.
- 5 World malaria report 2019. World Health Organization, Geneva, **2019**. ISBN: 978-92-4-156572-1.
- 6 Cibulskis, R. E., Alonso, P., Aponte, J., Aregawi, M., Barrette, A., Bergeron, L., Fergus, C. A., Knox, T., Lynch, M., Patouillard, E., Schwarte, S., Stewart, S., Williams, R.: Malaria: global progress 2000 – 2015 and future challenges. *Infect. Dis. Poverty* **2016**, 5, 61.
- 7 Achieving the malaria MDG target: reversing the incidence of malaria 2000-2015. World Health Organization, Geneva, **2015**. ISBN: 978-92-4-150944-2.
- 8 Global technical strategy for malaria, 2016-2030. World Health Organization, Geneva, **2015**. ISBN: 978-92-4-156499-1.
- 9 Schumacher, R.-F., Spinelli, E.: Malaria in children. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2012**, 4, e2012073. DOI: 10.4084/MJHID.2012.073.
- 10 Sachs, J., Malaney, P.: The economic and social burden of malaria. *Nature* **2002**, 415, 680–685. DOI: 10.1038/415680a.
- 11 Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., van Voorhis, W. C., Wells, T. N. C.: Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, 3, 17050. DOI: 10.1038/nrdp.2017.50.
- 12 Bruce-Chwatt, L. J.: *Falciparum* nomenclature. *Parasitol. Today* **1987**, 3, 252. DOI: 10.1016/0169-4758(87)90153-0.
- 13 Simpson, J. A., Silamut, K., Chotivanich, K., Pukrittayakamee, S., White, N. J.: Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 93, 165–168. DOI: 10.1016/S0035-9203(99)90295-X.
- 14 Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K.: Malaria: biology and disease. *Cell* **2016**, 167, 610–624. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.055.

-
- 15 White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., Dondorp, A. M.: Malaria. *Lancet* **2014**, 383, 723–735. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0.
- 16 Collins, W. E., Jeffery, G. M.: *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, 20, 579–592. DOI: 10.1128/CMR.00027-07.
- 17 Howard, R. J., Barnwell, J. W., Rock, E. P., Neequaye, J., Ofori-Adjei, D., Lee Maloy, W., Lyon, J. A., Saul, A.: Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1988**, 27, 207–223. DOI: 10.1016/0166-6851(88)90040-0.
- 18 Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I., Marsh, K.: Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* **1989**, 341, 57–59. DOI: 10.1038/341057a0.
- 19 Barnwell, J. W., Asch, A. S., Nachman, R. L., Yamaya, M., Aikawa, M., Ingravallo, P.: A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **1989**, 84, 765–772. DOI: 10.1172/JCI114234.
- 20 Ockenhouse, C. F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K. E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M., Lobb, R. R.: Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* **1992**, 176, 1183–1189. DOI: 10.1084/jem.176.4.1183.
- 21 Roberts, D. D., Sherwood, J. A., Spitalnik, S. L., Panton, L. J., Howard, R. J., Dixit, V. M., Frazier, W. A., Miller, L. H., Ginsburg, V.: Thrombospondin binds *falciparum* malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* **1985**, 318, 64–66. DOI: 10.1038/318064a0.
- 22 Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., Theander, T. G.: Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* **2013**, 498, 502–505. DOI: 10.1038/nature12216.
- 23 Fried, M., Duffy, P. E.: Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* **1996**, 272, 1502–1504. DOI: 10.1126/science.272.5267.1502.
- 24 Salanti, A., Dahlbäck, M., Turner, L., Nielsen, M. A., Barfod, L., Magistrado, P., Jensen, A. T. R., Lavstsen, T., Ofori, M. F., Marsh, K., Hviid, L., Theander, T. G.: Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J. Exp. Med.* **2004**, 200, 1197–1203. DOI: 10.1084/jem.20041579.

- 25 Niang, M., Bei, A. K., Madnani, K. G., Pelly, S., Dankwa, S., Kanjee, U., Gunalan, K., Amaladoss, A., Yeo, K. P., Bob, N. S., Malleret, B., Duraisingh, M. T., Preiser, P. R.: STEVOR is a *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein that mediates merozoite invasion and rosetting. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 81–93. DOI: 10.1016/j.chom.2014.06.004.
- 26 Goel, S., Palmkvist, M., Moll, K., Joannin, N., Lara, P., Akhouri, R. R., Moradi, N., Öjemalm, K., Westman, M., Angeletti, D., Kjellin, H., Lehtiö, J., Blixt, O., Idestrom, L., Gahmberg, C. G., Storry, J. R., Hult, A. K., Olsson, M. L., Heijne, G. von, Nilsson, I., Wahlgren, M.: RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 314–317. DOI: 10.1038/nm.3812.
- 27 Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., Doumbo, O. K.: The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**, *415*, 673–679. DOI: 10.1038/415673a.
- 28 Suwanarusk, R., Cooke, B. M., Dondorp, A. M., Silamut, K., Sattabongkot, J., White, N. J., Udomsangpetch, R.: The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 190–194. DOI: 10.1086/380468.
- 29 Handunnetti, S. M., David, P. H., Perera, K. L., Mendis, K. N.: Uninfected erythrocytes form "rosettes" around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1989**, *40*, 115–118. DOI: 10.4269/ajtmh.1989.40.115.
- 30 Roberts, D. J., Craig, A. G., Berendt, A. R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., Newbold, C. I.: Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* **1992**, *357*, 689–692. DOI: 10.1038/357689a0.
- 31 Fernandez, V., Treutiger, C. J., Nash, G. B., Wahlgren, M.: Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 2969–2975. DOI: 10.1128/IAI.66.6.2969-2975.1998.
- 32 Pain, A., Ferguson, D. J., Kai, O., Urban, B. C., Lowe, B., Marsh, K., Roberts, D. J.: Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 1805–1810. DOI: 10.1073/pnas.98.4.1805.

- 33 Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., Barrell, B.: Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**, 419, 498–511. DOI: 10.1038/nature01097.
- 34 Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., Singh, B.: *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46, 165–171. DOI: 10.1086/524888.
- 35 Paululat, A., Purschke, G.: Wörterbuch der Zoologie. Tiernamen, allgemeinbiologische, anatomische, entwicklungsbiologische, genetische, physiologische und ökologische Termini. 8. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2011**, S. 61.
- 36 Guidelines for malaria vector control. World Health Organization, Geneva, **2019**. ISBN: 978-92-4-155049-9.
- 37 Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., Benz, D., Gething, P. W., Howes, R. E., Patil, A. P., Temperley, W. H., Bangs, M. J., Chareonviriyaphap, T., Elyazar, I. R. F., Harbach, R. E., Hemingway, J., Manguin, S., Mbogo, C. M., Rubio-Palis, Y., Godfray, H. C. J.: Developing global maps of the dominant *anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Med.* **2010**, 7, e1000209. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000209.
- 38 Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C. M., Hemingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Okara, R. M., van Boeckel, T., Godfray, H. C. J., Harbach, R. E., Hay, S. I.: The dominant *anopheles* vectors of human malaria in africa, europe and the middle east: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites Vectors* **2010**, 3, 117. DOI: 10.1186/1756-3305-3-117.
- 39 Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets. World Health Organization, Geneva, **2013**. ISBN: 978-92-4-150527-7.
- 40 Collins, W. E.: *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annu. Rev. Entomol.* **2012**, 57, 107–121. DOI: 10.1146/annurev-ento-121510-133540.
- 41 Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., Corbellino, M.: Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2012**, 4, e2012013. DOI: 10.4084/MJHID.2012.013.

-
- 42 Josling, G. A., Llinás, M.: Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 573–587. DOI: 10.1038/nrmicro3519.
- 43 Daily, J. P.: Malaria 2017: update on the clinical literature and management. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2017**, *19*, 28. DOI: 10.1007/s11908-017-0583-8.
- 44 Mutschler: Arzneimittelwirkungen. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Menzel, S., Ruth, P. (Hg.). 10. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart **2013**, S. 1019-1020.
- 45 van den Bercken, J., Vijverberg, H. P. M.: Mode of action of pyrethroid insecticides. In: Galli C. L., Manzo L., Spencer P.S. (Hg.): Recent advances in nervous system toxicology. NATO ASI Ser. A, **1988**, Vol. 100, 5, 91-105. Springer, Boston, MA.
- 46 Hille, B.: Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. *J. Gen. Physiol.* **1968**, *51*, 199–219. DOI: 10.1085/jgp.51.2.199.
- 47 Coats, J. R.: Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 255–262. DOI: 10.1289/ehp.9087255.
- 48 Fukuto, T. R.: Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 245–254. DOI: 10.1289/ehp.9087245.
- 49 Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016. World Health Organization, Geneva, **2018**. ISBN: 978-92-4-151405-7.
- 50 Liu, N.: Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* **2015**, *60*, 537–559. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020828.
- 51 Derua, Y. A., Kweka, E. J., Kisinza, W. N., Githeko, A. K., Mosha, F. W.: Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 426. DOI: 10.1186/s13071-019-3683-5.
- 52 Dalitz, M. K.: Autochthone Malaria im mitteldeutschen Raum. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2004**, 2-4.
- 53 Ouédraogo, A. L., Bastiaens, G. J. H., Tiono, A. B., Guelbéogo, W. M., Kobylinski, K. C., Ouédraogo, A., Barry, A., Bougouma, E. C., Nebie, I., Ouattara, M. S., Lanke, K. H. W., Fleckenstein, L., Sauerwein, R. W., Slater, H. C., Churcher, T. S., Sirima, S. B., Drakeley, C., Bousema, T.: Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: a double-blind, randomized, clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 357–365. DOI: 10.1093/cid/ciu797.

- 54 Souza, D. K. de, Larbi, I., Boakye, D. A., Okebe, J.: Ivermectin treatment in humans for reducing malaria transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, CD013117. DOI: 10.1002/14651858.CD013117.
- 55 Oliva, C. F., Vreysen, M. J. B., Dupé, S., Lees, R. S., Gilles, J. R. L., Gouagna, L.-C., Chhem, R.: Current status and future challenges for controlling malaria with the sterile insect technique: technical and social perspectives. *Acta Trop.* **2014**, 132 Suppl., 130-9. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.11.019.
- 56 Burt, A.: Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2014**, 369, 20130432. DOI: 10.1098/rstb.2013.0432.
- 57 Elvidge, S.: First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA. *Pharm. J.* **2015**, 295. DOI: 10.1211/PJ.2015.20069061.
- 58 Gordon, D. M., McGovern, T. W., Krzych, U., Cohen, J. C., Schneider, I., LaChance, R., Heppner, D. G., Yuan, G., Hollingdale, M., Slaoui, M.: Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* **1995**, 171, 1576–1585. DOI: 10.1093/infdis/171.6.1576.
- 59 RTS, S, Clinical Trials Partnership: Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **2015**, 386, 31-45. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60721-8.
- 60 World Health Organization: Malaria vaccine launched in Kenya: Kenya joins Ghana and Malawi to roll out landmark vaccine in pilot introduction. URL: www.afro.who.int/news/malaria-vaccine-launched-kenya-kenya-joins-ghana-and-malawi-roll-out-landmark-vaccine-pilot, aktualisiert am 13.09.2019, abgerufen am 02.05.2020.
- 61 Model list of essential medicines, 21st List, 2019. World Health Organization, Geneva, **2019**. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>, abgerufen am 19.10.2020.
- 62 Rudo, A., Zeller, K.-P., Siehl, H.-U., Berger, S., Sicker, D.: Chinin, ein legendäres Alkaloid. *Chem. Unserer Zeit* **2018**, 52, 238–248. DOI: 10.1002/ciuz.201800820.
- 63 Stork, G., Niu, D., Fujimoto, R. A., Koft, E. R., Balkovec, J. M., Tata, J. R., Dake, G. R., Fujimoto, A.: The first stereoselective total synthesis of quinine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3239–3242. DOI: 10.1021/ja004325r.
- 64 Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, Geneva, **2015**. ISBN: 978-92-4-154912-7.

- 65 Cheruiyot, J., Ingasia, L. A., Omondi, A. A., Juma, D. W., Opot, B. H., Ndegwa, J. M., Mativo, J., Cheruiyot, A. C., Yeda, R., Okudo, C., Muiruri, P., Bidii, N. S., Chebon, L. J., Angienda, P. O., Eyase, F. L., Johnson, J. D., Bulimo, W. D., Andagalu, B., Akala, H. M., Kamau, E.: Polymorphisms in *Pfmdr1*, *Pfcrt*, and *Pfnhe1* genes are associated with reduced in vitro activities of quinine in *Plasmodium falciparum* isolates from western Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3737–3743. DOI: 10.1128/AAC.02472-14.
- 66 Sidhu, A. B. S., Uhlemann, A.-C., Valderramos, S. G., Valderramos, J.-C., Krishna, S., Fidock, D. A.: Decreasing *Pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J. Infect. Dis.* **2006**, *194*, 528–535. DOI: 10.1086/507115.
- 67 Dow, G., Bauman, R., Caridha, D., Cabezas, M., Du, F., Gomez-Lobo, R., Park, M., Smith, K., Cannard, K.: Mefloquine induces dose-related neurological effects in a rat model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1045–1053. DOI: 10.1128/AAC.50.3.1045-1053.2006.
- 68 Bindschedler, M., Lefèvre, G., Degen, P., Sioufi, A.: Comparison of the cardiac effects of the antimalarials co-artemether and halofantrine in healthy participants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 293–298. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.66.293.
- 69 Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J., Anstey, N. M.: *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 79–87. DOI: 10.4269/ajtmh.2007.77.79.
- 70 Slater, A. F., Cerami, A.: Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* **1992**, *355*, 167–169. DOI: 10.1038/355167a0.
- 71 Egan, T. J., Mavuso, W. W., Ross, D. C., Marques, H. M.: Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 137–145. DOI: 10.1016/S0162-0134(97)00086-X.
- 72 Kumar, S., Guha, M., Choubey, V., Maity, P., Bandyopadhyay, U.: Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life sciences* **2007**, *80*, 813–828. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.11.008.
- 73 Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J., Krugliak, M.: Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1305–1313. DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00184-1.
- 74 Price, R. N., Seidlein, L. von, Valecha, N., Nosten, F., Baird, J. K., White, N. J.: Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 982–991. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70855-2.

- 75 Nomura, T., Carlton, J. M., Baird, J. K., del Portillo, H. A., Fryauff, D. J., Rathore, D., Fidock, D. A., Su, X., Collins, W. E., McCutchan, T. F., Wootton, J. C., Wellems, T. E.: Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J. Infect. Dis.* **2001**, 183, 1653–1661. DOI: 10.1086/320707.
- 76 Foote, S. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F., Kemp, D. J.: Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* **1989**, 57, 921–930. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90330-9.
- 77 Ferreira, P. E., Holmgren, G., Veiga, M. I., Uhlén, P., Kaneko, A., Gil, J. P.: *PfMDR1*: mechanisms of transport modulation by functional polymorphisms. *PLoS One* **2011**, 6, e23875. DOI: 10.1371/journal.pone.0023875.
- 78 Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K., Cowman, A. F.: Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2000**, 403, 906–909. DOI: 10.1038/35002615.
- 79 Holmgren, G., Gil, J. P., Ferreira, P. M., Veiga, M. I., Obonyo, C. O., Björkman, A.: Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *Pfcr*t 76T and *Pfmdr*1 86Y. *Infect. Genet. Evol.* **2006**, 6, 309–314. DOI: 10.1016/j.meegid.2005.09.001.
- 80 Sisowath, C., Ferreira, P. E., Bustamante, L. Y., Dahlström, S., Mårtensson, A., Björkman, A., Krishna, S., Gil, J. P.: The role of *Pfmdr*1 in *Plasmodium falciparum* tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. *Trop. Med. Int. Health* **2007**, 12, 736–742. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2007.01843.x.
- 81 Price, R. N., Cassar, C., Brockman, A., Duraisingh, M., van Vugt, M., White, N. J., Nosten, F., Krishna, S.: The *Pfmdr*1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 2943–2949. DOI: 10.1128/AAC.43.12.2943.
- 82 Hatton, C., Bunch, C., Peto, T., Pasvol, G., Russell, S. J., Singer, C., Edwards, G., Winstanley, P.: Frequency of severe neutropenia associated with amodiaquine prophylaxis against malaria. *Lancet* **1986**, 327, 411–414. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)92371-8.
- 83 Neftel, K. A., Woodtly, W., Schmid, M., Frick, P. G., Fehr, J.: Amodiaquine induced agranulocytosis and liver damage. *Br. Med. J.* **1986**, 292, 721–723. DOI: 10.1136/bmj.292.6522.721.
- 84 Winstanley, P., Edwards, G., Orme, M., Breckenridge, A.: The disposition of amodiaquine in man after oral administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1987**, 23, 1–7. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1987.tb03002.x.

- 85 Pascual, A., Madamet, M., Bertaux, L., Amalvict, R., Benoit, N., Travers, D., Cren, J., Taudon, N., Rogier, C., Parzy, D., Pradines, B.: In vitro piperazine susceptibility is not associated with the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene. *Malar. J.* **2013**, *12*, 431. DOI: 10.1186/1475-2875-12-431.
- 86 Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L., Bongard, E., Robinson, B. L., Peters, W., Croft, S. L.: Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination in vitro and in vivo. *Acta Trop.* **2008**, *105*, 222–228. DOI: 10.1016/j.actatropica.2007.12.005.
- 87 Peters, W., Robinson, B. L.: The chemotherapy of rodent malaria. LV. Interactions between pyronaridine and artemisinin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1997**, *91*, 141–145. DOI: 10.1080/00034983.1997.11813123.
- 88 Madamet, M., Briolant, S., Amalvict, R., Benoit, N., Bouchiba, H., Cren, J., Pradines, B.: The *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter is associated with the ex vivo *P. falciparum* African parasite response to pyronaridine. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 77. DOI: 10.1186/s13071-016-1358-z.
- 89 Pryce, J., Hine, P.: Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, *1*, CD006404. DOI: 10.1002/14651858.CD006404.pub3.
- 90 Nzila, A.: The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 1043–1054. DOI: 10.1093/jac/dkl104.
- 91 White, N. J.: Clinical pharmacokinetics of antimalarial drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **1985**, *10*, 187–215. DOI: 10.2165/00003088-198510030-00001.
- 92 Vestergaard Olsen, V., Loft, S., Dencker Christensen, K.: Serious reactions during malaria prophylaxis with pyrimethamine-sulfadoxine. *Lancet* **1982**, *320*, 994. DOI: 10.1016/S0140-6736(82)90202-1.
- 93 Peterson, D. S., Di Santi, S. M., Pova, M., Calvosa, V. S., Do Rosario, V. E., Wellems, T. E.: Prevalence of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis for pyrimethamine-resistant *falciparum* malaria in the brazilian amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *45*, 492–497. DOI: 10.4269/ajtmh.1991.45.492.
- 94 Foote, S. J., Galatis, D., Cowman, A. F.: Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 3014–3017. DOI: 10.1073/pnas.87.8.3014.

- 95 Canfield, C. J., Pudney, M., Gutteridge, W. E.: Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Exp. Parasitol.* **1995**, 80, 373–381. DOI: 10.1006/expr.1995.1049.
- 96 Srivastava, I. K., Vaidya, A. B.: A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1334–1339. DOI: 10.1128/AAC.43.6.1334.
- 97 Luzzatto, L.: The rise and fall of the antimalarial Lapdap: a lesson in pharmacogenetics. *Lancet* **2010**, 376, 739–741. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60396-0.
- 98 Fry, M., Pudney, M.: Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 1545–1553. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90213-3.
- 99 Syafruddin, D., Siregar, J. E., Marzuki, S.: Mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, 104, 185–194. DOI: 10.1016/S0166-6851(99)00148-6.
- 100 Srivastava, I. K., Morrissey, J. M., Darrouzet, E., Daldal, F., Vaidya, A. B.: Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* **1999**, 33, 704–711. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01515.x.
- 101 Skinner-Adams, T. S., Fisher, G. M., Riches, A. G., Hutt, O. E., Jarvis, K. E., Wilson, T., Itzstein, M. von, Chopra, P., Antonova-Koch, Y., Meister, S., Winzeler, E. A., Clarke, M., Fidock, D. A., Burrows, J. N., Ryan, J. H., Andrews, K. T.: Cyclization-blocked proguanil as a strategy to improve the antimalarial activity of atovaquone. *Commun. Biol.* **2019**, 2, 166. DOI: 10.1038/s42003-019-0397-3.
- 102 Tan, K. R., Hwang, J.: Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of *Plasmodium vivax*. *J. Travel Med.* **2018**, 25, 1–2. DOI: 10.1093/jtm/tay071.
- 103 Brueckner, R. P., Lassetter, K. C., Lin, E. T., Schuster, B. G.: First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, 58, 645–649. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.58.645.
- 104 Hounkpatin, A. B., Kreidenweiss, A., Held, J.: Clinical utility of tafenoquine in the prevention of relapse of *Plasmodium vivax* malaria: a review on the mode of action and emerging trial data. *Infect. Drug Resist.* **2019**, 12, 553–570. DOI: 10.2147/IDR.S151031.

- 105 Baird, J. K., Wiady, I., Sutanihardja, A., Suradi, Purnomo, Basri, H., Sekartuti, Ayomi, E., Fryauff, D. J., Hoffman, S. L.: Short report: therapeutic efficacy of chloroquine combined with primaquine against *Plasmodium falciparum* in northeastern Papua, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 66, 659–660. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.66.659.
- 106 Chu, C. S., Freedman, D. O.: Tafenoquine and G6PD: a primer for clinicians. *J. Travel Med.* **2019**, 1, 4. DOI: 10.1093/jtm/taz023.
- 107 Nkhoma, E. T., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. A., Beutler, E.: The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol. Dis.* **2009**, 42, 267–278. DOI: 10.1016/j.bcmd.2008.12.005.
- 108 Beutler, E.: The hemolytic effect of primaquine and related compounds: a review. *Blood* **1959**, 14, 103–139. DOI: 10.1182/blood.V14.2.103.103.
- 109 Manjurano, A., Sepulveda, N., Nadjm, B., Mtove, G., Wangai, H., Maxwell, C., Olomi, R., Reyburn, H., Riley, E. M., Drakeley, C. J., Clark, T. G.: African glucose-6-phosphate dehydrogenase alleles associated with protection from severe malaria in heterozygous females in Tanzania. *PLoS Genet.* **2015**, 11, e1004960. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004960.
- 110 Pybus, B. S., Marcsisin, S. R., Jin, X., Deye, G., Sousa, J. C., Li, Q., Caridha, D., Zeng, Q., Reichard, G. A., Ockenhouse, C., Bennett, J., Walker, L. A., Ohrt, C., Melendez, V.: The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar. J.* **2013**, 12, 212. DOI: 10.1186/1475-2875-12-212.
- 111 Marcsisin, S. R., Sousa, J. C., Reichard, G. A., Caridha, D., Zeng, Q., Roncal, N., McNulty, R., Careagabarja, J., Sciotti, R. J., Bennett, J. W., Zottig, V. E., Deye, G., Li, Q., Read, L., Hickman, M., Dhammika Nanayakkara, N. P., Walker, L. A., Smith, B., Melendez, V., Pybus, B. S.: Tafenoquine and NPC-1161B require CYP 2D metabolism for anti-malarial activity: implications for the 8-aminoquinoline class of anti-malarial compounds. *Malar. J.* **2014**, 13, 2. DOI: 10.1186/1475-2875-13-2.
- 112 Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., Rosenthal, P. J.: Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 3124–3131. DOI: 10.1128/AAC.00394-06.
- 113 Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., Granjeaud, S., Fusaï, T., Rogier, C., Pradines, B.: *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. *Malar. J.* **2010**, 9, 141. DOI: 10.1186/1475-2875-9-141.

-
- 114 Mutabingwa, T. K.: Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop.* **2005**, *95*, 305–315. DOI: 10.1016/j.actatropica.2005.06.009.
- 115 Su, X.-Z., Miller, L. H.: The discovery of artemisinin and the nobel prize in physiology or medicine. *Sci. China: Life Sci.* **2015**, *58*, 1175–1179. DOI: 10.1007/s11427-015-4948-7.
- 116 Li, Y.: Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33*, 1141–1146. DOI: 10.1038/aps.2012.104.
- 117 Vries, P. J. de, Dien, T. K.: Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. *Drugs* **1996**, *52*, 818–836. DOI: 10.2165/00003495-199652060-00004.
- 118 Li, Q. G., Peggins, J. O., Fleckenstein, L. L., Masonic, K., Heiffer, M. H., Brewer, T. G.: The pharmacokinetics and bioavailability of dihydroartemisinin, arteether, artemether, artesunic acid and artelinic acid in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 173–182. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1998.tb06173.x.
- 119 Kumar, N., Zheng, H.: Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* **1990**, *76*, 214–218. DOI: 10.1007/bf00930817.
- 120 Skinner, T. S., Manning, L. S., Johnston, W. A., Davis, T. M.: In vitro stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int. J. Parasitol.* **1996**, *26*, 519–525. DOI: 10.1016/0020-7519(96)89380-5.
- 121 Lu, F., He, X.-L., Richard, C.: A brief history of artemisinin: modes of action and mechanisms of resistance. *Chin. J. Nat. Med.* **2019**, *17*, 331–336. DOI: 10.1016/S1875-5364(19)30038-X.
- 122 Wang, J., Zhang, C.-J., Chia, W. N., Loh, C. C. Y., Li, Z., Lee, Y. M., He, Y., Yuan, L.-X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z.-C., Liu, B., Shen, H.-M., Tan, K. S. W., Lin, Q.: Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10111. DOI: 10.1038/ncomms10111.
- 123 Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., van Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., Krishna, S.: Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2003**, *424*, 957–961. DOI: 10.1038/nature01813.

- 124 Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., Gillett, D. L., Dick, L. R., Ralph, S. A., Dogovski, C., Spillman, N. J., Tilley, L.: Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 3801. DOI: 10.1038/s41467-018-06221-1.
- 125 Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., Rizk, S. S., Njimoh, D. L., Ryan, Y., Chotivanich, K., Nguon, C., Ghorbal, M., Lopez-Rubio, J.-J., Pfrender, M., Emrich, S., Mohandas, N., Dondorp, A. M., Wiest, O., Haldar, K.: A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2015**, 520, 683–687. DOI: 10.1038/nature14412.
- 126 Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P. J., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N. J.: Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 455–467. DOI: 10.1056/NEJMoa0808859.
- 127 Denis, M. B., Tsuyuoka, R., Lim, P., Lindegardh, N., Yi, P., Top, S. N., Socheat, D., Fandeur, T., Annerberg, A., Christophel, E. M., Ringwald, P.: Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop. Med. Int. Health* **2006**, 11, 1800–1807. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2006.01739.x.
- 128 Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., Fukuda, M. M.: Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 2619–2620. DOI: 10.1056/NEJMc0805011.
- 129 Vijaykumar, S., Rojanawatsirivej, C., Cholpol, S., Phoungmanee, D., Nakavej, A., Wongsrichanalai, C.: In vivo sensitivity monitoring of mefloquine monotherapy and artesunate-mefloquine combinations for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Thailand in 2003. *Trop. Med. Int. Health* **2006**, 11, 211–9. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01557.x.
- 130 Haldar, K., Bhattacharjee, S., Safeukui, I.: Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, 16, 156–170. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.161.
- 131 Nsanjabana, C.: Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): do not forget the partner drug! *Trop. Med. Infect. Dis.* **2019**, 4, 26. DOI: 10.3390/tropicalmed4010026.
- 132 Pasupureddy, R., Yadav, A., Seshadri, S., Pande, V., Dixit, R., Pandey, K. C.: Current scenario and future strategies to fight artemisinin resistance. *Parasitol. Res.* **2018**, 118, 29–42. DOI: 10.1007/s00436-018-6126-x.

- 133 Arieu, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Ménard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J.-C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., Ménard, D.: A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2014**, 505, 7481, 50–55. DOI: 10.1038/nature12876.
- 134 Chatterjee, A. K., Yeung, B. K. S.: Back to the future: lessons learned in modern target-based and whole-cell lead optimization of antimalarials. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, 12, 473–483. DOI: 10.2174/156802612799362977.
- 135 Butera, J. A.: Phenotypic screening as a strategic component of drug discovery programs targeting novel antiparasitic and antimycobacterial agents: an editorial. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 7715–7718. DOI: 10.1021/jm400443k.
- 136 Swinney, D. C., Anthony, J.: How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 507–519. DOI: 10.1038/nrd3480.
- 137 Burrows, J. N., Duparc, S., Gutteridge, W. E., van Hooft Huijsduijnen, R., Kaszubska, W., Macintyre, F., Mazzuri, S., Möhrle, J. J., Wells, T. N. C.: New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. *Malar. J.* **2017**, 16. DOI: 10.1186/s12936-016-1675-x.
- 138 Wells, T. N. C., van Hooft Huijsduijnen, R., van Voorhis, W. C.: Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 424–442. DOI: 10.1038/nrd4573.
- 139 Charman, S. A., Arbe-Barnes, S., Bathurst, I. C., Brun, R., Campbell, M., Charman, W. N., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Craft, J. C., Creek, D. J., Dong, Y., Matile, H., Maurer, M., Morizzi, J., Nguyen, T., Papastogiannidis, P., Scheurer, C., Shackleford, D. M., Sriraghavan, K., Stingelin, L., Tang, Y., Urwyler, H., Wang, X., White, K. L., Wittlin, S., Zhou, L., Vennerstrom, J. L.: Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108, 4400–4405. DOI: 10.1073/pnas.1015762108.
- 140 Phyto, A. P., Jittamala, P., Nosten, F. H., Pukrittayakamee, S., Imwong, M., White, N. J., Duparc, S., Macintyre, F., Baker, M., Möhrle, J. J.: Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16, 61–69. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00320-5.

- 141 Dong, Y., Chollet, J., Matile, H., Charman, S. A., Chiu, F. C. K., Charman, W. N., Scorneaux, B., Urwyler, H., Santo Tomas, J., Scheurer, C., Snyder, C., Dorn, A., Wang, X., Karle, J. M., Tang, Y., Wittlin, S., Brun, R., Vennerstrom, J. L.: Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides: charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4953–4961. DOI: 10.1021/jm049040u.
- 142 Gautam, A., Ahmed, T., Sharma, P., Varshney, B., Kothari, M., Saha, N., Roy, A., Moehrle, J. J., Paliwal, J.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of arterolane maleate following multiple oral doses in adult patients with *P. falciparum* malaria. *J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *51*, 1519–1528. DOI: 10.1177/0091270010385578.
- 143 Biot, C., Taramelli, D., Forfar-Bares, I., Maciejewski, L. A., Boyce, M., Nowogrocki, G., Brocard, J. S., Basilico, N., Olliaro, P., Egan, T. J.: Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 185–193. DOI: 10.1021/mp0500061.
- 144 Biot, C., Daher, W., Ndiaye, C. M., Melnyk, P., Pradines, B., Chavain, N., Pellet, A., Fraisse, L., Pelinski, L., Jarry, C., Brocard, J., Khalife, J., Forfar-Bares, I., Dive, D.: Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4707–4714. DOI: 10.1021/jm060259d.
- 145 Biot, C.: Ferroquine: a new weapon in the fight against malaria. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2004**, *3*, 135–147. DOI: 10.2174/1568012043354008.
- 146 Wani, W. A., Jameel, E., Baig, U., Mumtazuddin, S., Hun, L. T.: Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 534–551. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.07.009.
- 147 Wu, T., Nagle, A., Kuhen, K., Gagaring, K., Borboa, R., Francek, C., Chen, Z., Plouffe, D., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Wu, J., Ang, H. Q., Zeng, P., Kang, M. L., Tan, W., Tan, M., Ye, N., Lin, X., Caldwell, C., Ek, J., Skolnik, S., Liu, F., Wang, J., Chang, J., Li, C., Hollenbeck, T., Tuntland, T., Isbell, J., Fischli, C., Brun, R., Rottmann, M., Dartois, V., Keller, T., Diagana, T., Winzeler, E., Glynne, R., Tully, D. C., Chatterjee, A. K.: Imidazolopiperazines: hit to lead optimization of new antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5116–5130. DOI: 10.1021/jm2003359.

- 148 Nagle, A., Wu, T., Kuhen, K., Gagaring, K., Borboa, R., Francek, C., Chen, Z., Plouffe, D., Lin, X., Caldwell, C., Ek, J., Skolnik, S., Liu, F., Wang, J., Chang, J., Li, C., Liu, B., Hollenbeck, T., Tuntland, T., Isbell, J., Chuan, T., Alper, P. B., Fischli, C., Brun, R., Lakshminarayana, S. B., Rottmann, M., Diagana, T. T., Winzeler, E. A., Glynn, R., Tully, D. C., Chatterjee, A. K.: Imidazolopiperazines: lead optimization of the second-generation antimalarial agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4244–4273. DOI: 10.1021/jm300041e.
- 149 Kuhen, K. L., Chatterjee, A. K., Rottmann, M., Gagaring, K., Borboa, R., Buenviaje, J., Chen, Z., Francek, C., Wu, T., Nagle, A., Barnes, S. W., Plouffe, D., Lee, M. C. S., Fidock, D. A., Graumans, W., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., Wirjanata, G., Sebayang, B., Marfurt, J., Russell, B., Suwanarusk, R., Price, R. N., Nosten, F., Tungtaeng, A., Gettayacamin, M., Sattabongkot, J., Taylor, J., Walker, J. R., Tully, D., Patra, K. P., Flannery, E. L., Vinetz, J. M., Renia, L., Sauerwein, R. W., Winzeler, E. A., Glynn, R. J., Diagana, T. T.: KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5060–5067. DOI: 10.1128/AAC.02727-13.
- 150 LaMonte, G., Lim, M. Y.-X., Wree, M., Reimer, C., Nachon, M., Corey, V., Gedeck, P., Plouffe, D., Du, A., Figueroa, N., Yeung, B., Bifani, P., Winzeler, E. A.: Mutations in the *Plasmodium falciparum* cyclic amine resistance locus (*PfCARL*) confer multidrug resistance. *mBio* **2016**, *7*, e00696-16. DOI: 10.1128/mBio.00696-16.
- 151 Lim, M. Y.-X., LaMonte, G., Lee, M. C. S., Reimer, C., Tan, B. H., Corey, V., Tjahjadi, B. F., Chua, A., Nachon, M., Wintjens, R., Gedeck, P., Malleret, B., Renia, L., Bonamy, G. M. C., Ho, P. C.-L., Yeung, B. K. S., Chow, E. D., Lim, L., Fidock, D. A., Diagana, T. T., Winzeler, E. A., Bifani, P.: UDP-galactose and acetyl-CoA transporters as *Plasmodium* multidrug resistance genes. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16166. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.166.
- 152 Spillman, N. J., Allen, R. J. W., McNamara, C. W., Yeung, B. K. S., Winzeler, E. A., Diagana, T. T., Kirk, K.: Na(+) regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase *PfATP4* and is a target of the spiroindolone antimalarials. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 227–237. DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.006.
- 153 Spillman, N. J., Kirk, K.: The malaria parasite cation ATPase *PfATP4* and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* **2015**, *5*, 149–162. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2015.07.001.

- 154 Yeung, B. K. S., Zou, B., Rottmann, M., Lakshminarayana, S. B., Ang, S. H., Leong, S. Y., Tan, J., Wong, J., Keller-Maerki, S., Fischli, C., Goh, A., Schmitt, E. K., Krastel, P., Francotte, E., Kuhen, K., Plouffe, D., Henson, K., Wagner, T., Winzeler, E. A., Petersen, F., Brun, R., Dartois, V., Diagana, T. T., Keller, T. H.: Spirotetrahydro beta-carbolines (spiroindolones): a new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5155–5164. DOI: 10.1021/jm100410f.
- 155 White, N. J., Pukrittayakamee, S., Phyto, A. P., Rueangweerayut, R., Nosten, F., Jittamala, P., Jeeyapant, A., Jain, J. P., Lefèvre, G., Li, R., Magnusson, B., Diagana, T. T., Leong, F. J.: Spiroindolone KAE609 for *falciparum* and *vivax* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 371, 403–410. DOI: 10.1056/NEJMoa1315860.
- 156 Phillips, M. A., Gujjar, R., Malmquist, N. A., White, J., El Mazouni, F., Baldwin, J., Rathod, P. K.: Triazolopyrimidine-based dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with potent and selective activity against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3649–3653. DOI: 10.1021/jm8001026.
- 157 Gutteridge, W.: Conversion of dihydroorotate to orotate in parasitic protozoa. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 582, 390–401. DOI: 10.1016/0304-4165(79)90131-4.
- 158 Coteron, J. M., Marco, M., Esquivias, J., Deng, X., White, K. L., White, J., Koltun, M., El Mazouni, F., Kokkonda, S., Katneni, K., Bhamidipati, R., Shackleford, D. M., Angulo-Barturen, I., Ferrer, S. B., Jiménez-Díaz, M. B., Gamo, F.-J., Goldsmith, E. J., Charman, W. N., Bathurst, I., Floyd, D., Matthews, D., Burrows, J. N., Rathod, P. K., Charman, S. A., Phillips, M. A.: Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5540–5561. DOI: 10.1021/jm200592f.
- 159 Gujjar, R., El Mazouni, F., White, K. L., White, J., Creason, S., Shackleford, D. M., Deng, X., Charman, W. N., Bathurst, I., Burrows, J., Floyd, D. M., Matthews, D., Buckner, F. S., Charman, S. A., Phillips, M. A., Rathod, P. K.: Lead optimization of aryl and aralkyl amine-based triazolopyrimidine inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase with antimalarial activity in mice. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3935–3949. DOI: 10.1021/jm200265b.

- 160 Phillips, M. A., Lotharius, J., Marsh, K., White, J., Dayan, A., White, K. L., Njoroge, J. W., El Mazouni, F., Lao, Y., Kokkonda, S., Tomchick, D. R., Deng, X., Laird, T., Bhatia, S. N., March, S., Ng, C. L., Fidock, D. A., Wittlin, S., Lafuente-Monasterio, M., Benito, F. J. G., Alonso, L. M. S., Martinez, M. S., Jimenez-Diaz, M. B., Bazaga, S. F., Angulo-Barturen, I., Haselden, J. N., Louttit, J., Cui, Y., Sridhar, A., Zeeman, A.-M., Kocken, C., Sauerwein, R., Dechering, K., Avery, V. M., Duffy, S., Delves, M., Sinden, R., Ruecker, A., Wickham, K. S., Rochford, R., Gahagen, J., Iyer, L., Riccio, E., Mirsalis, J., Bathurst, I., Rueckle, T., Ding, X., Campo, B., Leroy, D., Rogers, M. J., Rathod, P. K., Burrows, J. N., Charman, S. A.: A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. *Sci. Transl. Med.* **2015**, 7, 296ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa6645.
- 161 Llanos-Cuentas, A., Casapia, M., Chuquiyauri, R., Hinojosa, J.-C., Kerr, N., Rosario, M., Toovey, S., Arch, R. H., Phillips, M. A., Rozenberg, F. D., Bath, J., Ng, C. L., Cowell, A. N., Winzeler, E. A., Fidock, D. A., Baker, M., Möhrle, J. J., van Hooft Huijsduijnen, R., Gobeau, N., Araeipour, N., Andenmatten, N., Rückle, T., Duparc, S.: Antimalarial activity of single-dose DSM265, a novel *plasmodium* dihydroorotate dehydrogenase inhibitor, in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria infection: a proof-of-concept, open-label, phase 2a study. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, 18, 874–883. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30309-8.
- 162 Younis, Y., Douelle, F., Feng, T.-S., González Cabrera, D., Le Manach, C., Nchinda, A. T., Duffy, S., White, K. L., Shackleford, D. M., Morizzi, J., Mannila, J., Katneni, K., Bhamidipati, R., Zabiulla, K. M., Joseph, J. T., Bashyam, S., Waterson, D., Witty, M. J., Hardick, D., Wittlin, S., Avery, V., Charman, S. A., Chibale, K.: 3,5-Diaryl-2-aminopyridines as a novel class of orally active antimalarials demonstrating single dose cure in mice and clinical candidate potential. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 3479–3487. DOI: 10.1021/jm3001373.
- 163 Paquet, T., Le Manach, C., Cabrera, D. G., Younis, Y., Henrich, P. P., Abraham, T. S., Lee, M. C. S., Basak, R., Ghidelli-Disse, S., Lafuente-Monasterio, M. J., Bantscheff, M., Ruecker, A., Blagborough, A. M., Zakutansky, S. E., Zeeman, A.-M., White, K. L., Shackleford, D. M., Mannila, J., Morizzi, J., Scheurer, C., Angulo-Barturen, I., Martinez, M. S., Ferrer, S., Sanz, L. M., Gamo, F. J., Reader, J., Botha, M., Dechering, K. J., Sauerwein, R. W., Tungtaeng, A., Vanachayangkul, P., Lim, C. S., Burrows, J., Witty, M. J., Marsh, K. C., Bodenreider, C., Rochford, R., Solapure, S. M., Jimenez-Diaz, M. B., Wittlin, S., Charman, S. A., Donini, C., Campo, B., Birkholtz, L.-M., Hanson, K. K., Drewes, G., Kocken, C. H. M., Delves, M. J., Leroy, D., Fidock, D. A., Waterson, D., Street, L. J., Chibale, K.: Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Sci. Transl. Med.* **2017**, 9. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad9735.

- 164 McNamara, C. W., Lee, M. C., Lim, C. S., Lim, S. H., Roland, J., Simon, O., Yeung, B. K., Chatterjee, A. K., McCormack, S. L., Manary, M. J., Zeeman, A.-M., Dechering, K. J., Kumar, T. S., Henrich, P. P., Gagaring, K., Ibanez, M., Kato, N., Kuhen, K. L., Fischli, C., Nagle, A., Rottmann, M., Plouffe, D. M., Bursulaya, B., Meister, S., Rameh, L., Trappe, J., Haasen, D., Timmerman, M., Sauerwein, R. W., Suwanarusk, R., Russell, B., Renia, L., Nosten, F., Tully, D. C., Kocken, C. H., Glynn, R. J., Bodenreider, C., Fidock, D. A., Diagana, T. T., Winzeler, E. A.: Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature* **2013**, 504, 248–253. DOI: 10.1038/nature12782.
- 165 Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A. R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D. C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Gracioti, M., Tobin, A. B., Doerig, C.: Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2011**, 2, 565. DOI: 10.1038/ncomms1558.
- 166 Alder, A.: Identifizierung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe und Validierung von PfGSK3 als potentiellen Medikamentenangriffspunkt gegen Malaria. Dissertation Universität Hamburg **2020**, 139-156.
- 167 Hanks, S. K., Hunter, T.: The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **1995**, 9, 576–596. DOI: 10.1096/fasebj.9.8.7768349.
- 168 Roskoski, R.: A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, 100, 1–23. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.07.010.
- 169 Johnson, L. N., Noble, M. E., Owen, D. J.: Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **1996**, 85, 149–158. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81092-2.
- 170 Schwartz, P. A., Murray, B. W.: Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 192–210. DOI: 10.1016/j.bioorg.2011.07.004.
- 171 Fabbro, D., Cowman-Jacob, S. W., Moebitz, H.: Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, 172, 2675–2700. DOI: 10.1111/bph.13096.
- 172 Huse, M., Kuriyan, J.: The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, 109, 275–282. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00741-9.
- 173 Liao, J. J.-L.: Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 409–424. DOI: 10.1021/jm0608107.

- 174 Fugel, W., Oberholzer, A. E., Gschloessl, B., Dzikowski, R., Pressburger, N., Preu, L., Pearl, L. H., Baratte, B., Ratin, M., Okun, I., Doerig, C., Kruggel, S., Lemcke, T., Meijer, L., Kunick, C.: 3,6-Diamino-4-(2-halophenyl)-2-benzoylthieno[2,3-*b*]pyridine-5-carbonitriles are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 264–275. DOI: 10.1021/jm301575n.
- 175 Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934. DOI: 10.1126/science.1075762.
- 176 Anamika, Srinivasan, N., Krupa, A.: A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins* **2005**, *58*, 180–189. DOI: 10.1002/prot.20278.
- 177 Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C.: Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* **2004**, *5*, 79. DOI: 10.1186/1471-2164-5-79.
- 178 Tewari, R., Straschil, U., Bateman, A., Böhme, U., Cherevach, I., Gong, P., Pain, A., Billker, O.: The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe* **2010**, *8*, 377–387. DOI: 10.1016/j.chom.2010.09.006.
- 179 Dorin, D., Semblat, J.-P., Pouillet, P., Alano, P., Goldring, J. P. D., Whittle, C., Patterson, S., Chakrabarti, D., Doerig, C.: *PfPK7*, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 184–196. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04393.x.
- 180 Doerig, C., Billker, O., Haystead, T., Sharma, P., Tobin, A. B., Waters, N. C.: Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol.* **2008**, *24*, 570–577. DOI: 10.1016/j.pt.2008.08.007.
- 181 Littler, D. R., Bullen, H. E., Harvey, K. L., Beddoe, T., Crabb, B. S., Rossjohn, J., Gilson, P. R.: Disrupting the allosteric interaction between the *Plasmodium falciparum* cAMP-dependent kinase and its regulatory subunit. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25375–25386. DOI: 10.1074/jbc.M116.750174.
- 182 Leykauf, K., Treeck, M., Gilson, P. R., Nebl, T., Bräulke, T., Cowman, A. F., Gilberger, T. W., Crabb, B. S.: Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000941. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000941.
- 183 Lasonder, E., Green, J. L., Camarda, G., Talabani, H., Holder, A. A., Langsley, G., Alano, P.: The *Plasmodium falciparum* schizont phosphoproteome reveals extensive phosphatidylinositol and cAMP-protein kinase A signaling. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 5323–5337. DOI: 10.1021/pr300557m.

- 184 Dawn, A., Singh, S., More, K. R., Siddiqui, F. A., Pachikara, N., Ramdani, G., Langsley, G., Chitnis, C. E.: The central role of cAMP in regulating *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of human erythrocytes. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004520. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004520.
- 185 Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Dluzewski, A. R., Margos, G., Williams, I. T., Blackman, M. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Mitchell, G. H.: *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3825–3834. DOI: 10.1242/jcs.00665.
- 186 Thomas, D. C., Ahmed, A., Gilberger, T. W., Sharma, P.: Regulation of *Plasmodium falciparum* glideosome associated protein 45 (PfGAP45) phosphorylation. *PLoS One* **2012**, *7*, e35855. DOI: 10.1371/journal.pone.0035855.
- 187 Alam, M. M., Solyakov, L., Bottrill, A. R., Flueck, C., Siddiqui, F. A., Singh, S., Mistry, S., Viskaduraki, M., Lee, K., Hopp, C. S., Chitnis, C. E., Doerig, C., Moon, R. W., Green, J. L., Holder, A. A., Baker, D. A., Tobin, A. B.: Phosphoproteomics reveals malaria parasite protein kinase G as a signalling hub regulating egress and invasion. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7285. DOI: 10.1038/ncomms8285.
- 188 Coolins, C. R., Hacket, F., Strath, M., Penzo, M., Withers-Martinez, C., Baker, D. A., Blackman, M. J.: Malaria parasite cGMP-dependent protein kinase regulates blood stage merozoite secretory organelle discharge and egress. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003344. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003344.
- 189 Brochet, M., Collins, M. O., Smith, T. K., Thompson, E., Sebastian, S., Volkmann, K., Schwach, F., Chappell, L., Gomes, A. R., Berriman, M., Rayner, J. C., Baker, D. A., Choudhary, J., Billker, O.: Phosphoinositide metabolism links cGMP-dependent protein kinase G to essential Ca²⁺ signals at key decision points in the life cycle of malaria parasites. *PLoS Biol.* **2014**, *12*, e1001806. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001806.
- 190 Govindasamy, K., Jebiwott, S., Jaijyan, D. K., Davidow, A., Ojo, K. K., van Voorhis, W. C., Brochet, M., Billker, O., Bhanot, P.: Invasion of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites requires cGMP-dependent protein kinase and calcium dependent protein kinase 4. *Mol. Microbiol.* **2016**, *102*, 349–363. DOI: 10.1111/mmi.13466.
- 191 Reininger, L., Wilkes, J. M., Bourgade, H., Miranda-Saavedra, D., Doerig, C.: An essential aurora-related kinase transiently associates with spindle pole bodies during *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogony. *Mol. Microbiol.* **2011**, *79*, 205–221. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07442.x.

- 192 Ghartey-Kwansah, G., Yin, Q., Li, Z., Gumpfer, K., Sun, Y., Yang, R., Wang, D., Jones, O., Zhou, X., Wang, L., Bryant, J., Ma, J., Boampong, J. N., Xu, X.: Calcium-dependent protein kinases in malaria parasite development and infection. *Cell Transplant.* **2020**, 29, 1-12. DOI: 10.1177/0963689719884888.
- 193 Kumar, S., Kumar, M., Ekka, R., Dvorin, J. D., Paul, A. S., Madugundu, A. K., Gilberger, T., Gowda, H., Duraisingh, M. T., Keshava Prasad, T. S., Sharma, P.: *PfCDPK1* mediated signaling in erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 63. DOI: 10.1038/s41467-017-00053-1.
- 194 Bansal, A., Singh, S., More, K. R., Hans, D., Nangalia, K., Yogavel, M., Sharma, A., Chitnis, C. E.: Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 (*PfCDPK1*) and its role in microneme secretion during erythrocyte invasion. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 1590–1602. DOI: 10.1074/jbc.M112.411934.
- 195 Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Liu, P., Luo, Y., Gunalan, K., Li, Y., Ribeiro, J. M. C., Miller, L. H.: *PfCDPK1* is critical for malaria parasite gametogenesis and mosquito infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115, 774–779. DOI: 10.1073/pnas.1715443115.
- 196 Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Mu, J., Miller, L. H.: *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 2 is critical for male gametocyte exflagellation but not essential for asexual proliferation. *mBio* **2017**, 8, e01656-17. DOI: 10.1128/mBio.01656-17.
- 197 Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nybäck, S., Louis, C., Sinden, R. E., Billker, O.: *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol. Microbiol.* **2006**, 60, 1355–1363. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05189.x.
- 198 Fang, H., Klages, N., Baechler, B., Hillner, E., Yu, L., Pardo, M., Choudhary, J., Brochet, M.: Multiple short windows of calcium-dependent protein kinase 4 activity coordinate distinct cell cycle events during *Plasmodium* gametogenesis. *eLife* **2017**, 6, e26524. DOI: 10.7554/eLife.26524.
- 199 Absalon, S., Blomqvist, K., Rudlaff, R. M., DeLano, T. J., Pollastri, M. P., Dvorin, J. D.: Calcium-dependent protein kinase 5 is required for release of egress-specific organelles in *Plasmodium falciparum*. *mBio* **2018**, 9, e00130-18. DOI: 10.1128/mBio.00130-18.
- 200 Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., Sinnis, P.: Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe* **2007**, 2, 316–327. DOI: 10.1016/j.chom.2007.10.002.
- 201 Kumar, P., Tripathi, A., Ranjan, R., Halbert, J., Gilberger, T., Doerig, C., Sharma, P.: Regulation of *Plasmodium falciparum* development by calcium-dependent protein kinase 7 (*PfCDPK7*). *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 20386–20395. DOI: 10.1074/jbc.M114.561670.

- 202 Batty, M. B., Schittenhelm, R. B., Doerig, C., Garcia-Bustos, J.: Interaction of *Plasmodium falciparum* casein kinase 1 with components of host cell protein trafficking machinery. *IUBMB Life* **2020**, 72, 1243–1249. DOI: 10.1101/617571.
- 203 Dorin-Semblat, D., Demarta-Gatsi, C., Hamelin, R., Armand, F., Carvalho, T. G., Moniatte, M., Doerig, C.: Malaria parasite-infected erythrocytes secrete PfCK1, the *Plasmodium* homologue of the pleiotropic protein kinase casein kinase 1. *PLoS One* **2015**, 10, e0139591. DOI: 10.1371/journal.pone.0139591.
- 204 Dorin-Semblat, D., Schmitt, S., Semblat, J.-P., Sicard, A., Reininger, L., Goldring, D., Patterson, S., Quashie, N., Chakrabarti, D., Meijer, L., Doerig, C.: *Plasmodium falciparum* NIMA-related kinase Pfnek-1: sex specificity and assessment of essentiality for the erythrocytic asexual cycle. *Microbiology* **2011**, 157, 2785–2794. DOI: 10.1099/mic.0.049023-0.
- 205 Reininger, L., Tewari, R., Fennell, C., Holland, Z., Goldring, D., Ranford-Cartwright, L., Billker, O., Doerig, C.: An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 20858–20868. DOI: 10.1074/jbc.M109.017988.
- 206 Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semblat, D., Doerig, C., Goldring, D., Harmse, L., Ranford-Cartwright, L., Packer, J., Doerig, C.: A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 31957–31964. DOI: 10.1074/jbc.M504523200.
- 207 Abdi, A., Eschenlauer, S., Reininger, L., Doerig, C.: SAM domain-dependent activity of PfTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Mol. Life Sci.* **2010**, 67, 3355–3369. DOI: 10.1007/s00018-010-0434-3.
- 208 Dorin-Semblat, D., Sicard, A., Doerig, C., Ranford-Cartwright, L., Doerig, C.: Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **2008**, 7, 279–285. DOI: 10.1128/EC.00245-07.
- 209 Philip, N., Haystead, T. A.: Characterization of a UBC13 kinase in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 7845–7850. DOI: 10.1073/pnas.0611601104.
- 210 Kats, L. M., Fernandez, K. M., Glenister, F. K., Herrmann, S., Buckingham, D. W., Siddiqui, G., Sharma, L., Bamert, R., Lucet, I., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O., Cooke, B. M.: An exported kinase (FIKK4.2) that mediates virulence-associated changes in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Int. J. Parasitol.* **2014**, 44, 319–328. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.01.003.

- 211 Nunes, M. C., Okada, M., Scheidig-Benatar, C., Cooke, B. M., Scherf, A.: *Plasmodium falciparum* FIKK kinase members target distinct components of the erythrocyte membrane. *PLoS One* **2010**, 5, e11747. DOI: 10.1371/journal.pone.0011747.
- 212 Jirage, D., Chen, Y., Caridha, D., O'Neil, M. T., Eyase, F., Witola, W. H., Mamoun, C. B., Waters, N. C.: The malarial CDK *Pfmrk* and its effector *PfMAT1* phosphorylate DNA replication proteins and co-localize in the nucleus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, 172, 9–18. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.03.009.
- 213 Halbert, J., Ayong, L., Equinet, L., Le Roch, K., Hardy, M., Goldring, D., Reininger, L., Waters, N., Chakrabarti, D., Doerig, C.: A *Plasmodium falciparum* transcriptional cyclin-dependent kinase-related kinase with a crucial role in parasite proliferation associates with histone deacetylase activity. *Eukaryot. Cell* **2010**, 9, 952–959. DOI: 10.1128/EC.00005-10.
- 214 Eubanks, A. L., Perkins, M. M., Sylvester, K., Ganley, J. G., Posfai, D., Sanschargin, P. C., Hong, J., Sliz, P., Derbyshire, E. R.: In silico screening and evaluation of *Plasmodium falciparum* protein kinase 5 (PK5) inhibitors. *ChemMedChem* **2018**, 13, 2479–2483. DOI: 10.1002/cmdc.201800625.
- 215 Graeser, R., Wernli, B., Franklin, R. M., Kappes, B.: *Plasmodium falciparum* protein kinase 5 and the malarial nuclear division cycles. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 82, 37–49. DOI: 10.1016/0166-6851(96)02716-8.
- 216 Dahalan, F. A., Sidek, H. M., Murtey, M. D., Embi, M. N., Ibrahim, J., Fei Tieng, L., Zakaria, N. A., Abdul-Aziz, N. M.: Phosphorylated and nonphosphorylated *PfMAP2* are localized in the nucleus, dependent on the stage of *Plasmodium falciparum* asexual maturation. *BioMed Res. Int.* **2016**, 2016, 1645097. DOI: 10.1155/2016/1645097.
- 217 Dorin-Semblat, D., Quashie, N., Halbert, J., Sicard, A., Doerig, C., Peat, E., Ranford-Cartwright, L., Doerig, C.: Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. *Mol. Microbiol.* **2007**, 65, 1170–1180. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05859.x.
- 218 Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C., Billker, O.: An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol. Microbiol.* **2005**, 58, 1253–1263. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04793.x.
- 219 Kern, S., Agarwal, S., Huber, K., Gehring, A. P., Strödke, B., Wirth, C. C., Brügl, T., Abodo, L. O., Dandekar, T., Doerig, C., Fischer, R., Tobin, A. B., Alam, M. M., Bracher, F., Pradel, G.: Inhibition of the SR protein-phosphorylating CLK kinases of *Plasmodium falciparum* impairs blood stage replication and malaria transmission. *PLoS One* **2014**, 9, e105732. DOI: 10.1371/journal.pone.0105732.

- 220 Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C., Meijer, L.: *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1697, 181–196. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.11.023.
- 221 Kruggel, S., Lemcke, T.: Generation and evaluation of a homology model of PfGSK-3. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2009**, 342, 327–332. DOI: 10.1002/ardp.200800158.
- 222 Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F., Woodgett, J. R.: Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **1993**, 12, 803–808. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05715.x.
- 223 Frame, S., Cohen, P., Biondi, R. M.: A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* **2001**, 7, 1321–1327. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00253-2.
- 224 Frame, S., Cohen, P.: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, 359, 1–16. DOI: 10.1042/0264-6021:3590001.
- 225 Kruggel, S.: Molecular-Modelling-Untersuchungen zu strukturellen Voraussetzungen, Bindungsmodus und Design von Inhibitoren der plasmodialen Glykogen Synthase Kinase-3. Dissertation Universität Hamburg **2011**, S. 47-49.
- 226 Osolodkin, D. I., Zakharevich, N. V., Palyulin, V. A., Danilenko, V. N., Zefirov, N. S.: Bioinformatic analysis of glycogen synthase kinase 3: human versus parasite kinases. *Parasitology* **2011**, 138, 725–735. DOI: 10.1017/S0031182011000151.
- 227 Mundwiler-Pachlatko, E., Beck, H.-P.: Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 19987–19994. DOI: 10.1073/pnas.1309247110.
- 228 Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., Young, M. W.: A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the drosophila circadian clock. *Cell* **2001**, 105, 769–779. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00383-X.
- 229 Prinz, B., Harvey, K. L., Wilcke, L., Ruch, U., Engelberg, K., Biller, L., Lucet, I., Erkelenz, S., Heincke, D., Spielmann, T., Doerig, C., Kunick, C., Crabb, B. S., Gilson, P. R., Gilberger, T. W.: Hierarchical phosphorylation of apical membrane antigen 1 is required for efficient red blood cell invasion by malaria parasites. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 34479. DOI: 10.1038/srep34479.
- 230 Sakai, R., Higa, T., Jefford, C. W., Bernardinelli, G.: Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6404–6405. DOI: 10.1021/ja00280a055.

- 231 Peng, J., Kudrimoti, S., Prasanna, S., Odde, S., Doerksen, R. J., Pennaka, H. K., Choo, Y.-M., Rao, K. V., Tekwani, B. L., Madgula, V., Khan, S. I., Wang, B., Mayer, A. M. S., Jacob, M. R., Tu, L. C., Gertsch, J., Hamann, M. T.: Structure-activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 61–76. DOI: 10.1021/jm900672t.
- 232 Ang, K. K., Holmes, M. J., Higa, T., Hamann, M. T., Kara, U. A.: In vivo antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1645–1649. DOI: 10.1128/aac.44.6.1645-1649.2000.
- 233 Masch, A.: Neue Thieno[2,3-*b*]pyridine als Hemmstoffe des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2017**, S. 92–94.
- 234 Prentis, R. A., Lis, Y., Walker, S. R.: Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964–1985). *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1988**, 25, 387–396. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1988.tb03318.x.
- 235 Thomas, V. H., Bhattachar, S., Hitchingham, L., Zocharski, P., Naath, M., Surendran, N., Stoner, C. L., El-Kattan, A.: The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, 2, 591–608. DOI: 10.1517/17425255.2.4.591.
- 236 Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R.: A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, 12, 413–420. DOI: 10.1023/a:1016212804288.
- 237 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3–26. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.
- 238 Navia, M., Charturvedi, P.: Design principles for orally bioavailable drugs. *Drug Discov. Today* **1996**, 1, 179–189. DOI: 10.1016/1359-6446(96)10020-9.
- 239 Di, L., Kerns, E. H.: Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 402–408. DOI: 10.1016/S1367-5931(03)00055-3.
- 240 Goodwin, J. T., Conradi, R. A., Ho, N. F., Burton, P. S.: Physicochemical determinants of passive membrane permeability: role of solute hydrogen-bonding potential and volume. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3721–3729. DOI: 10.1021/jm010253i.
- 241 Leeson, P. D., Springthorpe, B.: The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 881–890. DOI: 10.1038/nrd2445.

- 242 Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D.: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623. DOI: 10.1021/jm020017n.
- 243 Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P.: Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714–3717. DOI: 10.1021/jm000942e.
- 244 Kerns, E. H., Di, L., Carter, G. T.: In vitro solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* **2008**, *9*, 879–885. DOI: 10.2174/138920008786485100.
- 245 Saal, C., Petereit, A. C.: Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 589–595. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.07.019.
- 246 Ishikawa, M., Hashimoto, Y.: Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1539–1554. DOI: 10.1021/jm101356p.
- 247 Bhattachar, S. N., Deschenes, L. A., Wesley, J. A.: Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 1012–1018. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.09.002.
- 248 Bevan, C. D., Lloyd, R. S.: A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1781–1787. DOI: 10.1021/ac9912247.
- 249 Glomme, A.: Biorelevante Löslichkeit schwerlöslicher Arzneistoffe, Dissertation, Cuvillier Verlag, Göttingen **2004**, S. 1.
- 250 Lipinski, C. A.: Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235–249. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00107-6.
- 251 Hill, A. P., Young, R. J.: Getting physical in drug discovery: a contemporary perspective on solubility and hydrophobicity. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 648–655. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.05.016.
- 252 Testa, B., Carrupt, P. A., Gaillard, P., Billois, F., Weber, P.: Lipophilicity in molecular modeling. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 335–343. DOI: 10.1023/a:1016024005429.
- 253 Jain, N., Yalkowsky, S. H.: Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 234–252. DOI: 10.1002/1520-6017(200102)90:2<234::AID-JPS14>3.0.CO;2-V.
- 254 Yalkowsky, S. H., Valvani, S. C.: Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 912–922. DOI: 10.1002/jps.2600690814.

- 255 Yalkowsky, S. H.: Solubility and partial miscibility. In: *Solubility and Solubilization in aqueous media*, Oxford University Press, Oxford, UK **1999**, S. 49-80.
- 256 Ando, H. Y., Radebaugh, G. W.: Property-based drug design and preformulation. In: Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA **2005**, S. 720-744.
- 257 Chu, K. A., Yalkowsky, S. H.: An interesting relationship between drug absorption and melting point. *Int. J. Pharm.* **2009**, 373, 24–40. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.026.
- 258 Delaney, J. S.: ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, 44, 1000–1005. DOI: 10.1021/ci034243x.
- 259 Ali, J., Camilleri, P., Brown, M. B., Hutt, A. J., Kirton, S. B.: In silico prediction of aqueous solubility using simple QSPR models: the importance of phenol and phenol-like moieties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 2950–2957. DOI: 10.1021/ci300447c.
- 260 Ritchie, T. J., Macdonald, S. J. F.: The impact of aromatic ring count on compound developability--are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discov. Today* **2009**, 14, 1011–1020. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.07.014.
- 261 Kerns, E. H., Di, L.: Drug-like properties: concepts, structure design and methods - from ADME to toxicity optimization, Academic Press, Amsterdam, Boston **2008**, S. 59.
- 262 Baragaña, B., Hallyburton, I., Lee, M. C. S., Norcross, N. R., Grimaldi, R., Otto, T. D., Proto, W. R., Blagborough, A. M., Meister, S., Wirjanata, G., Ruecker, A., Upton, L. M., Abraham, T. S., Almeida, M. J., Pradhan, A., Porzelle, A., Luksch, T., Martínez, M. S., Bolscher, J. M., Woodland, A., Norval, S., Zuccotto, F., Thomas, J., Simeons, F., Stojanovski, L., Osuna-Cabello, M., Brock, P. M., Churcher, T. S., Sala, K. A., Zakutansky, S. E., Jiménez-Díaz, M. B., Sanz, L. M., Riley, J., Basak, R., Campbell, M., Avery, V. M., Sauerwein, R. W., Dechering, K. J., Noviyanti, R., Campo, B., Frearson, J. A., Angulo-Barturen, I., Ferrer-Bazaga, S., Gamo, F. J., Wyatt, P. G., Leroy, D., Siegl, P., Delves, M. J., Kyle, D. E., Wittlin, S., Marfurt, J., Price, R. N., Sinden, R. E., Winzeler, E. A., Charman, S. A., Bebrevska, L., Gray, D. W., Campbell, S., Fairlamb, A. H., Willis, P. A., Rayner, J. C., Fidock, D. A., Read, K. D., Gilbert, I. H.: A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* **2015**, 522, 315–320. DOI: 10.1038/nature14451.
- 263 Hou, T., Wang, J., Zhang, W., Xu, X.: ADME evaluation in drug discovery. 6. Can oral bioavailability in humans be effectively predicted by simple molecular property-based rules? *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 460–463. DOI: 10.1021/ci6003515.

- 264 Hopkins, A. L., Keserü, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C., Reynolds, C. H.: The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 105–121. DOI: 10.1038/nrd4163.
- 265 Hopkins, A. L., Groom, C. R., Alex, A.: Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430–431. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03069-7.
- 266 Reynolds, C. H., Tounge, B. A., Bembenek, S. D.: Ligand binding efficiency: trends, physical basis, and implications. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2432–2438. DOI: 10.1021/jm701255b.
- 267 Kenny, P. W.: The nature of ligand efficiency. *J. Cheminf.* **2019**, *11*, 8. DOI: 10.1186/s13321-019-0330-2.
- 268 Kenny, P. W., Leitão, A., Montanari, C. A.: Ligand efficiency metrics considered harmful. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2014**, *28*, 699–710. DOI: 10.1007/s10822-014-9757-8.
- 269 Schweda, S. I., Alder, A., Gilberger, T., Kunick, C.: 4-Arylthieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxamides are a new class of antiplasmodial agents. *Molecules* **2020**, *25*, 3187. DOI: 10.3390/molecules25143187.
- 270 Masch, A., Nasereddin, A., Alder, A., Bird, M. J., Schweda, S. I., Preu, L., Doerig, C., Dzikowski, R., Gilberger, T. W., Kunick, C.: Structure–activity relationships in a series of antiplasmodial thieno[2,3-*b*]pyridines. *Malar. J.* **2019**, *18*, 89. DOI: 10.1186/s12936-019-2725-y.
- 271 Klebe, G.: Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2009**, S. 307.
- 272 Pagadala, N. S., Syed, K., Tuszynski, J.: Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 91–102. DOI: 10.1007/s12551-016-0247-1.
- 273 Sottriffer, C.: Virtual screening: principles, challenges, and practical guidelines - Methods and principles in medicinal chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2011**, S. 153–162.
- 274 Sousa, S. F., Fernandes, P. A., Ramos, M. J.: Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **2006**, *65*, 15–26. DOI: 10.1002/prot.21082.
- 275 Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R.: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897.
- 276 Cambridge Crystallographic Data Centre **2020**: GOLD user guide - A component of the CSD-discovery. 2020.1 CSD release. URL: https://ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/GOLD_User_Guide_2020_1.pdf, abgerufen am 19.10.2020.

- 277 Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Taylor, R. D.: Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **2003**, 52, 609–623. DOI: 10.1002/prot.10465.
- 278 Aoki, M., Yokota, T., Sugiura, I., Sasaki, C., Hasegawa, T., Okumura, C., Kohno, T., Sugio, S., Matsuzaki, T.: Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, 60, 439–446. DOI: 10.2210/pdb1j1b/pdb.
- 279 Zhang, H. C., Bonaga, L. V., Ye, H., Derian, C. K., Damiano, B. P., Maryanoff, B. E.: Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2863–2868. DOI: 10.2210/pdb2ow3/pdb.
- 280 Kruggel, S., Lemcke, T.: Comparative investigation of the ATP-binding site of human and plasmodial glycogen synthase kinase-3. *QSAR Comb. Sci.* **2009**, 28, 885–890. DOI: 10.1002/qsar.200860193.
- 281 Yongpruksa, N., Pandey, S., Baker, G. A., Harmata, M.: Benzothiazines in organic synthesis. Synthesis of fluorescent 7-amino-2,1-benzothiazines. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 7979–7982. DOI: 10.1039/c1ob06051a.
- 282 Cho, S.-D., Park, Y.-D., Kim, J.-J., Lee, S.-G., Ma, C., Song, S.-Y., Joo, W.-H., Falck, J. R., Shiro, M., Shin, D.-S., Yoon, Y.-J.: A one-pot synthesis of pyrido[2,3-*b*][1,4]oxazin-2-ones. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7918–7920. DOI: 10.1021/jo034593i.
- 283 Singh, R., Sylvain, C., Holland, S., Zhang, J., Partridge, J. J., Clough, J.: Triazole derivatives useful as AXL inhibitors. Patent: WO 2007/030680 A2, **2007**.
- 284 Sharanin, Yu. A., Shestopalov, A. M., Litvinov, V. P., Klokel, G. V., Mortikov, V. Yu., Demerkov, A. S.: Cyclization of nitriles. XXV. Synthesis and reactions of chalcogen-containing 6-amino-3,5-dicyanopyridines. *Russ. J. Org. Chem.* **1988**, 24, 771–776.
- 285 Zhuang, Q.-Y., Xu, J.-N., TU, S.-J., JIA, R.-H., Zhang, J.-Y., LI, C.-M., Zhou, D.-X.: A simple one-pot synthesis of 3,5-dicyano-1,2-dihydropyrid-2-ones in aqueous media. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25, 1568–1572. DOI: 10.1002/CJOC.200790289.
- 286 Evdokimov, N. M., Magedov, I. V., Kireev, A. S., Kornienko, A.: One-step, three-component synthesis of pyridines and 1,4-dihydropyridines with manifold medicinal utility. *Org. Lett.* **2006**, 8, 899–902. DOI: 10.1021/ol052994.

- 287 Evdokimov, N. M., Kireev, A. S., Yakovenko, A. A., Antipin, M. Y., Magedov, I. V., Kornienko, A.: One-step synthesis of heterocyclic privileged medicinal scaffolds by a multicomponent reaction of malononitrile with aldehydes and thiols. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3443–3453. DOI: 10.1021/jo070114u.
- 288 Zhu, X.-Q., Zou, H.-L., Yuan, P.-W., Liu, Y., Cao, L., Cheng, J.-P.: A detailed investigation into the oxidation mechanism of Hantzsch 1,4-dihydropyridines by ethyl α -cyanocinnamates and benzylidenemalononitriles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, *9*, 1857–1861. DOI: 10.1039/B003404P.
- 289 Shestopalov, A. M., Rodinovskaya, L. A., Zubarev, A. A., Nesterov, V. N., Ugrak, B. I., Dutova, T. Y.: Synthesis and domino reactions of polymethylene-3-cyanopyridine-2(1*H*)-thiones. *J. Heterocycl. Chem.* **2020**, *57*, 913–922. DOI: 10.1002/jhet.3836.
- 290 Guo, K., Thompson, M. J., Chen, B.: Exploring catalyst and solvent effects in the multicomponent synthesis of pyridine-3,5-dicarbonitriles. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6999–7006. DOI: 10.1021/jo901232b.
- 291 Guo, K., Thompson, M. J., Reddy, T. R., Mutter, R., Chen, B.: Mechanistic studies leading to a new procedure for rapid, microwave assisted generation of pyridine-3,5-dicarbonitrile libraries. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5300–5311. DOI: 10.1016/j.tet.2007.03.139.
- 292 Dotsenko, V. V., Krivokolysko, S. G., Litvinov, V. P.: 1-(Cyanoacetyl)-3,5-dimethylpyrazole as active methylene compound in Hantzsch-type pyridine synthesis: a convenient and highly effective approach to 3,5-dicyano-4-(het)aryl-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyridine-2-thiolates. *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 607–613. DOI: 10.1007/s00706-007-0664-8.
- 293 Dyachenko, V. D., Krivokolysko, S. G., Litvinov, V. P.: Synthesis of arylmethylenecyanothioacetamides in a Michael reaction. *Mendeleev Commun.* **1998**, *8*, 23–24. DOI: 10.1070/MC1998v008n01ABEH000816.
- 294 Dyachenko, I. V., Dyachenko, V. D., Dorovatovskii, P. V., Khrustalev, V. N., Nenaydenko, V. G.: Synthesis of 2-alkylsulfanyl-6-amino-4-aryl-5-cyanonicotinonitriles by recyclization of 2,6-diamino-4-aryl-3,5-dicyano-4*H*-thiopyrans with alkyl halides. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, *54*, 1681–1688. DOI: 10.1134/S1070428018110106.
- 295 Sharanin, Yu. A., Krivokolysko, S. G., Dyachenko, V. D.: Cyclization reactions of nitriles. LIV. Synthesis and properties of 6-amino-4-aryl-3,5-dicyanopyridin-2(1*H*)-ones, the corresponding thiones, the pyridylidenemalononitriles, and their hydrogenated analogs. *J. Org. Chem.* **1994**, *30*, 620–626.

- 296 Litvinov, V. P., Promonenkov, V. K., Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Rodinovskaya, L. A., Mortikov, V. Y., Bogdanov, V. S.: Condensed pyridines communication 3. Arylidenethio(seleno)acetamides in the synthesis of 4-aryl-3-cyano-2[1H]pyridinethiones and 4-aryl-3-cyano-2[1H]pyridineselenones. *Russ. Chem. Bull.* **1985**, 34, 1940–1947. DOI: 10.1007/BF00953940.
- 297 Litvinov, V. P., Dotsenko, V. V., Krivokolysko, S. G.: The chemistry of thienopyridines. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2007**, 93, 117–178. DOI: 10.1002/chin.200737245.
- 298 Dyachenko, V. D., Krivokolysko, S. G., Sharanin, Y. A., Litvinov, V. P.: New method for the synthesis of 6-amino-4-aryl-3,5-dicyano-3,4-dihydropyridine-2(1H)-thiones by recyclization of 4-aryl-2,6-diamino-4H-thiopyranes. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1997**, 33, 793–798. DOI: 10.1007/BF02253028.
- 299 Sharanin, Yu. A., Promonenkov, V. K., Shestopalov, A. M., Nesterov, V. N., Melenchuk, S. N., Shklover, V. E., Struchkov, Yu. T.: Cyclization of nitriles. XXX. Synthesis, structure, and properties of 6-amino-4-aryl-(heteroaryl)-3,5-dicyano-2(1H)-pyridinthiones. *Russ. J. Org. Chem* **1989**, 25, 622–628.
- 300 Sharanin, Yu. A., Shestopalov, A. M., Nesterov, V. N., Melenchuk, S. N., Promonenkov, V. K., Shklover, V. E., Struchkov, Yu. T., Litvinov, V. P.: Cyclization of nitriles. XXXIII. Synthesis and structure of 4-aryl-2,6-diamino-3,5-dicyanothiopyrans and their recyclization to 6-amino-4-aryl-3,5-dicyano-2(1H)-pyridinethiones. *Russ. J. Org. Chem.* **1989**, 25, 1323–1330.
- 301 Sharanin, Yu. A., Shestopalov, A. M.: Cyclization of nitriles. XXXIV. Transformation of 4-aryl-2,6-diamino-3,5-dicyano-4H-thiopyrans into substituted 4-aryl-3-cyano-2(1H)-pyridinethiones and 2-amino-4-aryl-7,7-dimethyl-5-oxo-3-cyano-5,6,7,8-tetrahydro-4H-benzo[b]pyrans. *Russ. J. Org. Chem.* **1989**, 25, 1331–1335.
- 302 Dyachenko, I. V., Dyachenko, V. D.: A simple one-pot synthesis of new 4-unsubstituted 2-oxo(thioxo)-1,2-dihydropyridine-3-carbonitriles, -3-carboxamides, and -3-carboxylic acid esters and 2-thioxo-1,2,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carbonitriles. *Russ. J. Org. Chem.* **2015**, 51, 1293–1300. DOI: 10.1134/S1070428015090146.
- 303 Kupwade, R. V., Khot, S. S., Kulkarni, M. A., Desai, U. V., Wadgaonkar, P. P.: Diethylamine Dess–Martin periodinane: an efficient catalyst–oxidant combination in a sequential, one-pot synthesis of difficult to access 2-amino-3,5-dicarbonitrile-6-sulfanylpiperidines at ambient temperature. *RSC Adv.* **2017**, 7, 38877–38883. DOI: 10.1039/C7RA07738F.

- 304 Brunskill, J. S. A., De, A., Ewing, D. F.: Dimerisation of 3-aryl-2-cyanothioacrylamides. A $[2_s+4_s]$ cyclo-addition to give substituted 3,4-dihydro-2H-thiopyrans. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 6, 629–633. DOI: 10.1039/P19780000629.
- 305 Dyachenko, V. D., Litvinov, V. P.: Michael reaction in synthesis of 6-amino-4-(4-butoxyphenyl)-3,5-dicyanopyridine-2(1H)-thione. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1998**, 34, 188–194. DOI: 10.1007/BF02315182.
- 306 Yadav, J. S., Reddy, B. V. S., Basak, A. K., Visali, B., Narsaiah, A. V., Nagaiah, K.: Phosphane-catalyzed Knoevenagel condensation: a facile synthesis of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylonitriles. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3, 546–551. DOI: 10.1002/ejoc.200300513.
- 307 Elnagdi, M. H., Abdelrazek, F. M., Ibrahim, N. S., Erian, A. W.: Studies on alkylheteroaromatic compounds. The reactivity of alkyl polyfunctionally substituted azines towards electrophilic reagents. *Tetrahedron* **1989**, 45, 3597–3604. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)81038-3.
- 308 Abdel-Wadood, F. K., Abdel-Monem, M. I., Fahmy, A. M., Geies, A. A.: One-pot synthesis of 1,6-naphthyridines, pyranopyridines and thiopyranopyridines. *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **2008**, 63, 303–312. DOI: 10.1515/znb-2008-0314.
- 309 Abdel Galil, F. M., Sallam, M. M., Sherif, S. M., Elnagdi, M. H.: Activated nitriles in heterocyclic synthesis: the reaction of cyanothioacetamide with activated double bond systems. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 9, 1639–1644. DOI: 10.1002/jlac.198619860914.
- 310 Litvinov, V. P., Dotsenko, V. V., Krivokolysko, S. G.: Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity. *Russ. Chem. Bull.* **2005**, 54, 864–904. DOI: 10.1007/s11172-005-0333-1.
- 311 Litvinov, V. P., Rodinovskaya, L. A., Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Senning, A.: Advances in the chemistry of 3-cyanopyridin-2(1H)-ones, -thiones, and -selenones. *Sulfur rep.* **1992**, 13, 1–155. DOI: 10.1080/01961779208048951.
- 312 Sharanin, Y. A., Shestopalov, A. M., Promonenkov, V. K., Rodinovskaya, L. A.: Cyclization of nitriles. X. Enaminonitriles of the 1,3-dithia-4-cyclohexene series and their recyclization into pyridine and thiazole derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **1984**, 15, 1539. DOI: 10.1002/chin.198450238.
- 313 Kadushkin, A. V., Faermark, I. F., Shvarts, G. Y., Granik, V. G.: Synthesis and biological properties of 4-phenyl-amino- and 4-dimethylamino-3-cyanopyridine-2-thiones and the thieno[2,3-*b*]pyridines obtained from them. *Pharm. Chem. J.* **1993**, 26, 870–874. DOI: 10.1007/BF00767663.

- 314 Dyachenko, I. V., Dyachenko, V. D., Dorovatovskii, P. V., Khrustalev, V. N., Nenajdenko, V. G.: Multicomponent synthesis of 4-alkyl(aryl, hetaryl)-2-alkoxycarbonyl(aroyle, carbamoyl)-3,6-diamino-5-cyanothieno[2,3-*b*]pyridines. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, 54, 1435–1445. DOI: 10.1134/S1070428018100019.
- 315 Dyachenko, I. V., Karpov, E. N., Dyachenko, V. D.: Three-component synthesis of alkyl-substituted functionalized 4*H*-thiopyrans, 1,2- and 1,4-dihydropyridines, 2-alkylsulfanylpriidines, thieno[2,3-*b*]pyridines, and cyclohexa-1,3-diene. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, 85, 1063–1068. DOI: 10.1134/S1070363215050102.
- 316 Orban, O. C. F., Korn, R. S., Benítez, D., Medeiros, A., Preu, L., Loaëc, N., Meijer, L., Koch, O., Comini, M. A., Kunick, C.: 5-Substituted 3-chlorokenpaullone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 3790–3800. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.023.
- 317 Gad-Elkareem, M. A. M., Elneairy, M. A. A., Taha, A. M.: Reactions with 3,6-diaminothieno[2,3-*b*]pyridines: synthesis and characterization of several new fused pyridine heterocycles. *Heteroatom. Chem.* **2007**, 18, 405–413. DOI: 10.1002/hc.20313.
- 318 Encyclopedia of reagents for organic synthesis. Paquette, L. A., Crich, D. Fuchs, P. L., Molander, G. (Hg.). 2. Auflage, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK **2009**, S. 4187.
- 319 Baran, E. J., Piro, O. E., Echeverría, G. A., Parajón-Costa, B. S.: Structural and IR-spectroscopic characterization of pyridinium acesulfamate, a monoclinic twin. *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **2018**, 73, 753–758. DOI: 10.1515/znb-2018-0074.
- 320 Corrsin, L., Fax, B. J., Lord, R. C.: The vibrational spectra of pyridine and pyridine-*d*₅. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 1170–1176. DOI: 10.1063/1.1699158.
- 321 SDBSWeb: <https://sdb.sdb.aist.go.jp> (*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*), abgerufen am 14.07.2020.
- 322 Kromidas, S., Kuss, H.-J.: Chromatogramme richtig integrieren und bewerten. Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC, Wiley-VCH, Weinheim **2008**, S. 1-53.
- 323 User's Guide EZChrom Elite Help, Kapitel: Integration. Agilent Technologies, Inc. **2006**.
- 324 Instruction Manual for Chromaster System Manager, Vers. 3. May 2015, S. 14-25. Hitachi High-Tech Science Corporation.
- 325 Lovering, F., Bikker, J., Humblet, C.: Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6752–6756. DOI: 10.1021/jm901241e.
- 326 MarvinSketch Version 20.17, **2020**. ChemAxon, Budapest, Ungarn. URL: www.chemaxon.com.

- 327 Daina, A., Michielin, O., Zoete, V.: SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42717. DOI: 10.1038/srep42717.
- 328 Hoelke, B., Gieringer, S., Arlt, M., Saal, C.: Comparison of nephelometric, UV-spectroscopic, and HPLC methods for high-throughput determination of aqueous drug solubility in microtiter plates. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 3165–3172. DOI: 10.1021/ac9000089.
- 329 Bard, B., Martel, S., Carrupt, P.-A.: High throughput UV method for the estimation of thermodynamic solubility and the determination of the solubility in biorelevant media. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, 33, 230–240. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.12.002.
- 330 Loftsson, T., Hreinsdóttir, D.: Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: a technical note. *AAPS PharmSciTech* **2006**, 7, E29-E32. DOI: 10.1208/pt070104.
- 331 Huang, L.-F., Tong, W.-Q.: Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, 56, 321–334. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.007.
- 332 Wölfel, S.: Neue Inhibitoren der Anaplastic Lymphoma Kinase. Dissertation Technische Universität Braunschweig, Shaker Verlag, Aachen **2014**, S. 193.
- 333 Glomme, A.; März, J.; Dressman, J. B.: Predicting the intestinal solubility of poorly soluble drugs. In: Testa, B., Krämer, S. D., Wunderli-Allenspach, H., Folkers, G. (Hg.): Pharmacokinetic profiling in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Schweiz, **2006**, 481, 259-280.
- 334 S., D. Mithani, V. Bakatselou, C. N. TenHoor, J. B. Dressman: Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharm. Res.* **1996**, 13, 163–167. DOI: 10.1023/a:1016062224568.
- 335 Chen, T.-M., Shen, H., Zhu, C.: Evaluation of a method for high throughput solubility determination using a multi-wavelength UV plate reader. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2002**, 5, 575–581. DOI: 10.2174/1386207023330075.
- 336 Sanghvi, T., Jain, N., Yang, G., Yalkowsky, S. H.: Estimation of aqueous solubility by the general solubility equation (GSE): the easy way. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, 22, 258–262. DOI: 10.1002/qsar.200390020.
- 337 Molecular Operating Environment (MOE), 2018.01. Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada. H3A 2R7 **2018**.

- 338 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- 339 Abdel-rahman, A. E., Bakhite, E. A., Mohamed, O. S., Thabet, E. A.: Synthesis of some new thieno[2,3-*b*]pyridines, pyrido[3',2':4,5]-thieno[3,2-*d*]pyrimidines and pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*][1,2,3]-triazines. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2000**, 166, 149–171. DOI: 10.1080/10426500008076538.
- 340 Hauser, M.: Reaction of vinyl chloroacetate with nucleophilic reagents. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 43–46. DOI: 10.1021/jo01048a010.
- 341 Gaillot, J. M., Gelas-Mialhe, Y., Vessiere, R.: Synthesis and reactivity of 2-sulfonyl-2-haloaziridines. *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1958–1966.
- 342 Biel, J. H., Warawa, E. J.: *N*-Aryl-*N*'-Cyclopropyl-ethylene diamine derivatives. Patent: US 3365458, **1968**.
- 343 Khidre, M. D., Yakout, E.-S. M. A., Mahran, M. R. H.: Organophosphorus chemistry, 29. The action of 2,4-bis-(4-methoxy-phenyl)-1,3,2,4-dithiaphosphetane-2,4-disulfide (Lawesson's reagent) on α , β -unsaturated nitriles. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1998**, 133, 119–125. DOI: 10.1080/10426509808032459.
- 344 McCall, M. A.: Reactions of substituted methylenemalononitriles and their derivatives 1. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 2433–2439. DOI: 10.1021/jo01054a036.
- 345 Dyachenko, V. D., Dyachenko, A. D.: Cross-recyclization of 4-aryl-2,6-diamino-4*H*-thiopyran-3,5-dicarbonitriles with 1-morpholino-1-cyclopentene: new route to 4-aryl-2-thioxo-2,5,6,7-tetrahydro-1*H*-[1]pyridine-3-carbonitriles and their derivatives. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, 43, 280–285. DOI: 10.1134/S1070428007020212.
- 346 Sharanin, Yu. A., Promonenkov, V. K., Shestopalov, A. M.: Recyclization of 4-amino-6-aryl-5-cyano-1,3-dithia-4-cyclohexene-2-spirocycloalkanes to 4-aryl-3-cyano-5,6-polymethylenepyridine-2(1*H*)-thiones. *Russ. J. Org. Chem.* **1982**, 18, 1782–1783.
- 347 Dyachenko, V. D., Dyachenko, A. D.: Synthesis of 4-alkyl(aryl, hetaryl)-2-thioxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-3-carbonitriles and their derivatives by cross-recyclization of 4-alkyl(aryl, hetaryl)-2,6-diamino-4*H*-thiopyran-3,5-dicarbonitriles with 4-(cyclohex-1-en-1-yl)-morpholine, alkyl halides, and cyclohexanone. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, 44, 412–420. DOI: 10.1134/S1070428008030172.

- 348 Vieweg, H., Leistner, S., Wagner, G.: Synthese von 4-Aryl-3-cyan-5,6,7,8-tetrahydro-chinolin-2(1*H*)-thionen sowie von 3-Cyan-4-phenyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-cyclohepta-pyrid-2(1*H*)-thion und davon abgeleitete Thieno-Derivate. *Pharmazie* **1988**, *43*, 358–359.
- 349 Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D. I., Owens, R. J.: A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e45. DOI: 10.1093/nar/gkm047.
- 350 Malleret, B., Claser, C., Ong, A. S. M., Suwanarusk, R., Sriprawat, K., Howland, S. W., Russell, B., Nosten, F., Rénia, L.: A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 118. DOI: 10.1038/srep00118.
- 351 Trager, W., Jensen, J. B.: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673–675. DOI: 10.1126/science.781840.
- 352 Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J. X., Wilairat, P., Riscoe, M.: Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1803–1806. DOI: 10.1128/aac.48.5.1803-1806.2004.
- 353 Viswanadhan, V. N., Ghose, A. K., Revankar, G. R., Robins, R. K.: Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Model.* **1989**, *29*, 163–172. DOI: 10.1021/ci00063a006.
- 354 Klopman, G., Li, J.-Y., Wang, S., Dimayuga, M.: Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach. *J. Chem. Inf. Model.* **1994**, *34*, 752–781. DOI: 10.1021/ci00020a009.
- 355 Csizmadia, F., Tsantili-Kakoulidou, A., Panderi, I., Darvas, F.: Prediction of distribution coefficient from structure. 1. Estimation method. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 865–871. DOI: 10.1021/js960177k.
- 356 Scientific databases | SRC, Inc. <https://www.srcinc.com/what-we-do/environmental/scientific-databases.html>, abgerufen am 02.09.2020.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Mentor Herrn Prof. Dr. C. Kunick für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Überlassung des spannenden Themas bedanken. Außerdem bedanke ich mich für die überaus hervorragende fachliche Betreuung, die Inspirationen und die stets entgegengebrachte Unterstützung.

Beim Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. möchte ich mich herzlich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion und für die Teilnahme an Kongressen, sowie für die vielen interessanten Seminare und Veranstaltungen bedanken, die mir Einblicke in neue Bereiche ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. I. Ott (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) danke ich für die freundliche und reibungslose Übernahme des Korreferats. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Scherneck (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, TU Braunschweig) für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission sowie für die freundlich, aufbauenden Gespräche auch über das Thema hinaus.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. W. Gilberger (Universität Hamburg, Fachbereich Biologie; Centre for Structural Systems Biology und Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) und Herrn Dr. A. Alder (Universität Hamburg, Fachbereich Biologie; Centre for Structural Systems Biology und Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) für die Durchführung der biologischen Assays.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. K. Ibrom, Frau P. Holba-Schultz und Frau K. Fischer (Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig) sowohl für die Anfertigung der NMR-Spektren als auch die fachliche Unterstützung bei NMR-spezifischen Fragestellungen bedanken.

Herrn Dr. U. Papke und Frau C. Mlynek (Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig) danke ich für die Anfertigung der Massenspektren und für die stets hilfsbereite Beantwortung sämtlicher Fragen.

Für die Einwaagen der Verbindungen zur Bereitstellung biologischer Versuche und Löslichkeitsmessungen, die Aufnahme der IR-Spektren, die Ausführung der Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung der NMR-Versuche möchte ich mich bei Frau S. Meyer und Frau P. Reich (Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig) bedanken. Zusätzlich danke ich Herrn M. Söchtig und Frau J. Stiller-Stuve für die Versorgung mit Chemikalien. Herrn F. Roese und Herrn E. Hinz danke ich außerdem für die stets freundliche Hilfsbereitschaft bei technischen oder handwerklichen Problemen aller Art. Bei Herrn R. Hübner möchte ich mich für die tolle Unterstützung bei IT-Problemen bedanken. Frau D. Eberle, Frau B. Thomas und Frau C. Galius möchte ich für die vielseitigen organisatorischen Hilfestellungen danken.

Frau M. Handt (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, TU Braunschweig) danke ich herzlich für die Durchführung der DSC-Analysen.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. L. Preu für seine beeindruckende Unterstützung bei der Auswertung von NMR- und IR-Spektren bedanken.

Herrn Dr. O. Orban danke ich herzlich für die Betreuung zum Fachapotheker für pharmazeutische Analytik und Technologie sowie für viele fachliche und überfachliche Gespräche, Fragestellungen und seine entgegengebrachte Hilfsbereitschaft jeglicher Art.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie für die spannende, nervenaufreibende und schöne Zeit bedanken. Dabei möchte ich erneut Herrn Dr. O. Orban, Herrn Dr. C. Lechner und Herrn Dr. M. Karatas für die vielseitige Hilfsbereitschaft danken. Frau I. Ihnatenko danke ich für die zahlreichen Kletter-Impressionen und für das Schaffen einer fröhlichen Arbeitsatmosphäre. Herrn M. J. Müller danke ich für das stets offene Ohr und seine ausführliche Hilfsbereitschaft. Frau M. Flasshoff danke ich für die vielen fachlichen und überfachlichen Gespräche und Telefonate, die die Zeit am Institut sehr bereicherten. Herrn J. Lindhof danke ich für das reibungslose bike-sharing und die vielen ernsten sowie fröhlichen Gespräche. Herrn J. Baumgarten danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der HPLC und für die vielen interessanten Gespräche. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich von Herzen für die Unterstützung während der Promotion und das Lesen der Korrekturen danken.

Ebenso bedanke ich mich bei den Kollegen des ersten Semesters. Frau M. Olabi, Frau A. Schultz und Herrn A. Prause danke ich für die schönen, gemeinsamen (vielen) Stunden im Praktikum. Frau S. Patz möchte ich außerdem sowohl für ihre fachlichen Anregungen als auch für ihre überfachliche Unterstützung herzlich danken. Zusätzlich danke ich meinen Wahlpflichtstudenten Frau R. Elbers und Frau L. Fischer sowohl für die Untersuchung der Synthesebedingungen für **58a**, die Isolation von **81a**, als auch für die Synthese von **47j**.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung, Geduld und Rückhalt weder das Studium noch die Promotion denkbar gewesen wären. Ihr habt mich stets in allen Lebenslagen bestärkt und habt mir so viel ermöglicht – danke dafür! Meinem Bruder möchte ich dafür danken, dass er mir stets eine realitätsnahe Einordnung der Probleme vor Augen gehalten hat. Ebenso konnte ich immer auf seine Unterstützung zählen. Auch danke ich meiner Familie sowie Frau R. Öhlmann für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Meinem Partner danke ich für die entgegengebrachte Geduld und für die unentwegte Unterstützung in allen Lebenslagen.